Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE QUANTITATIVE IMMUNGLOBULIN-BESTIMMUNG MIT DER EINFACHEN RADIALEN IMMUNDIFFUSION IM VERGLEICH ZU ANDEREN BESTIMMUNGSMETHODEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HELMBRECHT KOCH
aus Stuttgart
1978

Druck: Blasaditsch GmbH · Theodor-Heuß-Platz 3 · 8900 Augsburg · Telefon 08 21/51 85 63

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE QUANTITATIVE IMMUNGLOBULIN-BESTIMMUNG MIT DER EINFACHEN RADIALEN IMMUNDIFFUSION IM VERGLEICH ZU ANDEREN BESTIMMUNGSMETHODEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
HELMBRECHT KOCH
aus Stuttgart
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H.J. Braun
	(Professor Dr. H.D. Waller)
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Fischer)

Meinen Eltern

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit danke ich Herrn Professor Dr.H.J.Braun.

Für anregende Diskussionen danke ich den Herren Dr.J.Bohner, Universitätsdozent Dr.W.Heinzel, Professor Dr.B.G.Johanssen, Professor Dr.E.Kallee und Privatdozent Dr.F.W.Tischendorf.

Mein Dank gilt weiter den Herren Dr.R.Ewald, Dr.P.Fiedler und Dr.A.Hasenböhler (Institut für Mikrobiologie I der Universität Tübingen) für Hinweise zu chromatographischen Verfahren sowie die Ermöglichung der Kjehldal-Untersuchung.

Für Diskussion und Bearbeitung statistischer Probleme danke ich Herrn Privatdozent Dr.R.J.Lorenz (Bundesanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Tübingen).

Schließlich möchte ich Frau J.Lersch und Frau I.Maier für ihre Hilfsbereitschaft und die Anleitung in verschiedenen Untersuchungstechniken meinen Dank aussprechen.

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

a	y-Achsenabstand bei der linearen Regression
Ab	Antikörper
Ag	Antigen
b	Regressionskoeffizient
c	Konzentration
d	Durchmesser
D	Diffusionskoeffizient
dl	Deziliter = 100 ml
E	Extinktion (Index gibt Wellenlänge an, z.B. E_{280})
EBP	Elektrophorese-Biuret-Proteinbestimmung
f	Durchflußrate (flow rate)
F	systematischer Fehler einer Methode
G	Gesamtfehler
GP	Grenzpuffer
h	Höhe (des Gels)
I	Ionenstärke
IEC	Ionenaustausch-(ion exchange)Chromatographie
M	molar
n	Fallzahl, Anzahl der Untersuchungen
p	Wahrscheinlichkeit
r	Korrelationskoeffizient
RID	Einfache radiale Immundiffusion
s	Standardabweichung
SP	Startpuffer
t	Zeit
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Variarionskoeffizient
V_e	Elutionsvolumen
V_o	Ausschlußvolumen (outer volume)
V_s	Probevolumen (sample volume)
V_t	Gesamtvolumen = Gelbettvolumen (total volume)
x	unabhängige Variable (Mittelwert $\bar{x}$)
y	abhängige Variable

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	6
1. Reindarstellung der Immunglobuline	6
1.1 Fällungsreaktionen, Gelfiltration, Ultrafiltration	6
1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)	7
1.3 Gelchromatographie	8
2. Protein-Bestimmungsmethoden	9
2.1 Stickstoffbestimmung nach KJEHLDAL	9
2.2 Trockengewichtsbestimmung	10
2.3 Biuret-Gesamteiweiß-Bestimmung	10
2.4 Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie	10
2.5 Immunelektrophorese	12
2.6 Einfache radiale Immundiffusion (RID)	12
3. Statistische Methoden	13
3.1 Fehlerrechnung	13
3.2 Signifikanztests	13
3.3 Lineare Regression und Korrelation	13
Ergebnisse	15
1. Reindarstellung der Immunglobuline	15
1.1 Vorreinigungen	15
1.2 Ionenaustauschchromatographie	15
1.3 Gelchromatographie	19
2. Protein-Bestimmungsmethoden	22
2.1 Stickstoffbestimmung nach KJEHLDAL	22
2.2 Biuret-Gesamteiweiß-Bestimmung	24
2.3 Vergleich von KJEHLDAL-, Trocken-gewichts- und Biuret-Ergebnissen	26
2.4 Zonenelektrophorese	28
2.5 Einfache radiale Immundiffusion	30
3. Vergleichsuntersuchungen von Lösungen monoklonaler Immunglobuline	39
3.1 Seren mit hoher Konzentration eines M-Gradienten	39

Seite

3.2 Mischlösungen monoklonaler Immunglobuline mit Reinalbumin 42

3.3 Reinlösungen monoklonaler Immunglobuline 46

4. Vergleichsuntersuchungen von Lösungen polyklonaler Immunglobuline 49

4.1 Seren mit erhöhtem Gehalt an polyklon. IgG 49

4.2 Mischlösungen polyklonalen Immunglobulins mit Reinalbumin 50

4.3 Reinlösungen von polyklonalem Immunglobulin 51

Diskussion 53

Zusammenfassung 77

Literaturverzeichnis 80

EINLEITUNG

Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline ist für viele klinische Fragestellungen von großer Bedeutung. LOU und SHANBROM (1967) haben die Indikationen zur Immunglobulin-Untersuchung zusammengestellt. Sie ist unentbehrlich zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung hypo- und agammaglobulinämischer Zustände, chronischer Entzündungen sowie maligner Systemerkrankungen. Oft genügt nicht die Pauschalbestimmung der Gammaglobuline, die routinemäßig mit zonenelektrischen Verfahren durchgeführt wird. Vielmehr ist es nötig, die Immunglobulinklassen IgG, IgA, IgM, IgE und IgD getrennt quantitativ zu erfassen. Solche Untersuchungen geben wertvolle Hinweise für Diagnose und Differentialdiagnose, Therapie, Verlauf und Schweregrad chronischer Leberkrankheiten (KLEINSCHMIDT und SCHLICHT 1977), allergischer Erkrankungen sowie des Plasmocytoms und der Makroglobulinämie WALDENSTRÖM (BRAUN 1967).

Zur Unterscheidung und Konzentrationsbestimmung der einzelnen Immunglobulinklassen stehen heute verschiedene immunologische Methoden zur Verfügung. Ihr Prinzip liegt in der Bildung von Antigen-Antikörper-Präzipitaten, die mit Hilfe spezieller Antiseren entstehen und in Lösungen oder Gelen meßbar gemacht werden können. Unter besonderen Bedingungen (HEIDELBERGER und KENDALL 1932, 1934, 1935 a und b) treten bei Titration antigenhaltiger Lösungen mit Antiseren Präzipitate auf, die als Trübungen eine Extinktionsänderung der Lösung bewirken. Daraus wurden die Methoden der Nephelometrie und Turbidimetrie entwickelt (SCHULTZE und SCHWICK 1959), die heute automatisiert sind (EBELING 1973, MARCRAFT und NEWSLAND 1973).

In Gelen gehen am Äquivalenzpunkt von Antigen- und Antikörperkonzentration die löslichen Ag-Ab-Komplexe ebenfalls in Präzipitate über, die mit bloßem Auge oder nach Anfärbung sichtbar sind. Die Techniken der Immunpräzipitation in Gelen werden nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt (BACKHAUSZ 1967, WORK und WORK 1969, CROWLE 1973). Die einfache Immundiffusion unterscheidet sich von der Doppeldiffusion dadurch, daß nur ein Partner der Immunreaktion - entweder Antigen oder Antikörper - von einer Auftragstelle aus diffundiert, während der andere in gleichmäßiger Konzentration im Gel verteilt ist. Dieses Vorgehen gestattet eine quantitative Auswertung der Diffusionsstrecke bis zum Präzipitat. Dagegen läßt die Doppeldiffusionstechnik, bei der Ag und Ab von verschiedenen Auftragstellen aufeinander zuwandern, niemals exakt quantitative Aussagen zu (OUCHTERLONY 1949,1962; BACKHAUSZ 1967).

Die einfache Immundiffusion wird nach der geometrischen Anordnung der Wanderrichtung weiter unterteilt in lineare und radiale Diffusion. Die lineare Diffusion nach OUDIN (1946, 1949, 1971; MÜLLER und MÜLLER-VOIGT 1967) läuft in einem gelgefüllten Röhrchen ab, in dem die ganze Front der aufgetragenen Lösung vertikal abwärts wandert, bis es zur Präzipitation kommt. Dagegen diffundiert bei der radialen Immundiffusion die Lösung von einem Auftragsloch aus horizontal ins Gel.

Die einfache radiale Immundiffusion (RID) nach MANCINI et al.(1965) oder nach FAHEY und McKELVEY (1965) ist heute die gebräuchlichste Methode zur quantitativen Immunglobulinbestimmung. Die im Handel erhältlichen Diffusionsplatten werden nach den Modifikationen der genannten Autoren benutzt und ausgewertet. MANCINI et al. messen die Präzipitatdurchmesser erst nach Beendigung des Diffusionsvorgangs aus. Die Präzipitatfläche ist dann linear proportional zur aufgetragenen Eiweiß-

konzentration. Diese Relation wird in den Untersuchungen von ALADJEM et al.(1968), KALFF (1970) und BERNE (1974) bestätigt.

FAHEY und McKELVEY (1965) messen den Präzipitatdurchmesser zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Beginn der Diffusion, zu dem der Durchmesser dem Logarithmus der aufgetragenen Konzentration proportional ist. Diese Auswertung wird auch von LOU und SHANBROM (1967), RICHTER (1972) und BERNE (1972,1974) beschrieben.

Für die Konzentrationsberechnung werden noch andere Modifikationen vorgeschlagen, z.B. $c \sim d$ (JAMES et al. 1966, MASSEYEFF und ZISSWILLER 1969) oder $\log c \sim \log d$ (RYAN 1967). SCHMID (1969 a), BERNE (1974) sowie RÄSÄNEN (1974) geben eine Übersicht der Auswertungsverfahren.

Die RID-Technik geht auf PETRIE (1932) zurück, der mit Hilfe des im Gel verteilten Antiserums Bakterien-Antigene (Toxine) identifizierte. Die RID kann auch zur Bestimmung von Antikörperkonzentrationen oder -titern verwendet werden, wenn im Gel verteilt Antigene vorhanden sind (STIEHM 1967, BECKER 1969, VAERMAN et al.1969 b). MANCINI et al.(1970) prüfen die Antigen-Verwandtschaft durch Beurteilung der Kreuzreaktion verschiedener Ag mit unterschiedlichen Antiseren (NASH et al.1970, CROWLE 1973).

Eine andere Methode zur quantitativen Erfassung einzelner Eiweißfraktionen ist die von LAURELL (1966) eingeführte Elektroimmundiffusion (BECKER 1967,BECKER et al. 1968, GRUBB 1970), von LAURELL (1972) als Elektroimmuno-Assay beschrieben und von WEEKE (1973) als Rocket-Immunelektrophorese modifiziert (VERBRUGGEN 1975). Wie bei der RID wird die Ag- (Ab-)Lösung in Löcher eines Ab- (Ag-)haltigen Gels einpippetiert, jedoch die Diffu-

sion durch Elektrophorese ersetzt. Von der Auftragstelle aus bilden sich spitzwinklige Präzipitate, deren Höhe oder Fläche der Ag- (Ab-)Konzentration proportional ist.

Trotz einer größeren Zahl von Methoden ist die quantitative Immunglobulinbestimmung auch heute noch problematisch. Da allen Verfahren das immunologische Prinzip der Ag-Ab-Präzipitation gemeinsam ist, hängt die Qualität der Ergebnisse von den Eigenschaften des im Gel verteilten Antiserums (oder Antigens) ab. Selbst bei Verwendung standardisierter Antiseren ist die Richtigkeit der Messwerte nicht immer gewährleistet, vor allem nicht bei Vorliegen einer mono- oder oligoklonalen Gammopathie.

Im Eiweißlabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen wurde im Lauf vieler Jahre die Beobachtung gemacht, daß Immunglobulin-Konzentrationen in Seren von Patienten mit Plasmocytom oder M. WALDENSTRÖM bei Bestimmung mit der RID oft exzessiv erhöht waren, während mit der Zonenelektrophorese und Biuretmethode wesentlich niedrigere Gamma-Globulinwerte ermittelt wurden. Von ASAMER et al.(1967) und COHNEN et al.(1967) werden solche Differenzen ebenfalls beschrieben. LIETZE et al. (1970) berichten von einem Fall, der bei einem Gesamt-Eiweißwert von 6,1 g/dl in der RID 6,1 g/dl IgG und zusätzlich 6,4 g/dl IgM aufwies. Stellt man den grundsätzlichen Unterschied der Methoden und die damit verbundene Fehlerbreite in Rechnung, so bleibt doch die Frage nach der Ursache dieser erheblichen Abweichung. Ergibt die RID bei höheren Immunglobulin-Konzentrationen zunehmend falsch hohe Werte oder sind die elektrophoretisch ermittelten Gammaglobulin-Konzentrationen zu niedrig ? BRAUN et al.(1973) haben auf das Problem hingewiesen und Lösungsvorschläge unterbreitet. RID-Ergebnisse differieren erheblich je nach Anteil der Immunglobulin-Unterklassen : BOKHOUT (1975 a) fand Unterschiede bis

100 %, REIMER und MADDISON (1976) um 50 % in gleichkonzentrierten Ag-Lösungen von M-Gradienten verschiedener IgG-Unterklassen.

Eine weitere Klärung der Frage ist im Hinblick auf die weite Verbreitung beider Methoden in der klinisch-immunologischen Diagnostik von großer theoretischer und praktischer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit soll daher die quantitative Bestimmung der Serum- und Lösungskonzentrationen mono- und polyklonaler Immunglobuline mit der RID nach MANCINI im Vergleich zu Zonenelektrophorese und Eiweißbestimmungsmethoden untersucht werden. Voraussetzung für die Gegenüberstellung von Ergebnissen der RID und der Gesamteiweiß-Untersuchungen ist die Reindarstellung von Immunglobulinen. Den Vorschlag für einen derartigen Ansatz machte schon KALFF (1970).

MATERIAL UND METHODEN

1. Reindarstellung der Immunglobuline

Geräte und Reagenzien	Hersteller
Chromatographiesäulen, Durchfluß-adapter (d = 2o-25 mm, h = o,3-1 m)	Pharmacia Fine Chem.,Uppsala Boehringer,Mannh.
UV-Extinktionsmesser "Uvicord"	LKB, Stockholm
Fraktionssammler "Hako-Fraktomat"	Haiss,Jungingen
Ultrafiltrationskammer 1 l, d = 7o mm	Chem.Instit.Tübg.
mit Membranen "Diaflo" PM 10	Amicon, Witten
Sephadex G 25 u.G 200, DEAE-Sephadex A 25 u.A 50, CM-Sephadex C 50, Dextranblau 2000	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

1.1 Fällungsreaktionen, Gelfiltration, Ultrafiltration

Ammonsulfatfällung : IgG wurde aus Serum in 40 %, IgM in 50 % Ammoniumsulfatlösung gefällt (HEIDE und HAUPT 1964, HELD und KALLEE 1968, EDBERG et al.1972).

Euglobulinfällung : Serum wurde mit Wasser 1:20 verdünnt und stand dann 48 Std. bei 4°C (ULLMANN und HESS 1968, HARBOE et al.1969). Bei einem anderen Verfahren wurde unverdünntes Serum in der Ultrafiltrationskammer gegen einen H_2O-Überschuß bis zum Euglobulinausfall dialysiert (BAILEY 1967).

Gelfiltration an Sephadex G 25 (DETERMANN 1967): An einer G-25-Gelsäule (V_t=120 ml, h=35-40 cm) wurden ca. 30 ml angereicherte Immunglobulinlösung mit o,o1 M Tris-HCl- oder o,o2 M Ammoniumbicarbonat-Puffer eluiert. Die Trennung von Eiweiß- und Sulfatfraktion wurde durch Eiweißbestimmung und Bariumchloridprobe (JANDER und BLASIUS 1969) gesichert.

Konzentrieren mit Sephadex G-25-coarse-Trockengel (DETERMANN 1967): Zur Einengung kleiner Volumina (2-10 ml) hochmolekularer Lösungen wurde ein Zentrifugeneinsatz entwickelt, in dem der gelhaltige Raum durch eine Membran vom Auffangbehälter getrennt ist. 5 Minuten nach Einpippetieren der Lösung ins Trockengel wurde bei 3000 Upm zentrifugiert, das verwendete Gel anschließend regeneriert. Die in 50 Proben festgestellten Konzentrierleistungen, die ebenso wie der Eiweißverlust stark schwankten, sind in Tab.1 zusammengestellt.

Trockengel pro ml Lösung	Konzentrierungsfaktor	Eiweißverlust
o,2 g/ml	1,8-2,2 fach	5-10 %
o,25 g/ml	2 -2,5 fach	5-15 %
o,33 g/ml	2,4- 3 fach	10-20 %
o,4 g/ml	2,8-5,8 fach	15-30 %

Tab.1: Einengung von Proteinlösungen an Sephadex G-25-coarse-Trockengel

Ultrafiltration zum Dialysieren und Konzentrieren (BAILEY 1967): Größere Lösungsvolumina bis 1 l wurden in der Ultrafiltrationskammer eingeengt und dialysiert. Die semipermeablen Membranen ("Diaflo" PM 10) erlaubten unter einem Druck von 3-5 Atm. Stickstoff eine Filtrationsrate von 50-100 ml/Std.

1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Säulenchromatographie : Das Bettvolumen der wie üblich vorbereiteten und eingefüllten IEC-Gele (DEAE-Sephadex A 50 und 25, CM-Sephadex C 50) betrug 100 bis 200 ml bei einer Füllhöhe von 20 bis 40 cm. Als Probevolumen V_s wurden 10-15 % von V_t (15-30 ml) aufgetragen. Anregungen zur Durchführung wurden den Arbeiten von PRELLWITZ und HAMMER (1966), KICKHÖFEN et al.(1968), KNEDEL und FATEH-MOGHADAM (1968) sowie DORFNER (1970) entnommen.

Die Probelösung bestand entweder aus unvorbehandeltem Serum oder aus Eluat der G-25-Gelfiltration (Eiweißmenge 5oo bis 2ooo mg, -konzentration 2,5 bis 8 g/1oo ml). Zur Elution wurde meist ein linear-kontinuierlicher Ionenstärkegradient angelegt, in einigen Fällen in Verbindung mit einem pH-Gradienten. Start- und Grenzpuffervolumina lagen im allgemeinen zwischen je 1CC und 150 ml, die Ionenstärke des Startpuffers (SP) zwischen o,o1 und o,1 , die des Grenzpuffers (GP) zwischen o,2 und 1,o. Der durchflußwirksame Druck betrug 6O-12O cm Wassersäule (2-3 cm/cm Füllhöhe h), womit Durchflußraten (f) von o,2-o,5 ml/min erzielt wurden. Die relative Eiweißkonzentration wurde fortlaufend gemessen und registriert. An einzelnen Fraktionen wurden absoluter Proteingehalt, pH und immunelektrophoretischer Reinheitsgrad untersucht. Jede Fraktion hatte 8-10 ml Volumen.

Batch-Verfahren: IgG wurde nach der Methode von BAUMSTARK et al.(1964) unter Berücksichtigung der Modifikationen von PERPER et al.(1967) dargestellt. Der Puffer (Kalium-/Dikaliumphosphat) wurde auf pH 7,5 eingestellt. Ein anderer Puffer war Ammoniumbicarbonat (pH 8,o). In einem Doppelansatz ließ sich aus unvorbehandeltem Serum reines IgG gewinnen. 50 ml Serum wurden mit Sephadex-A-50-Gel vermischt und nach einer Stunde das Eluat abfiltriert. Dieses wurde erneut auf A-50-Gel aufgetragen und nach einer weiteren Stunde das Eluat unter Startbedingungen abfiltriert. Die Regeneration des Gels erfolgte nach dem von BAUMSTARK et al. angegebenen Schema.

1.3 Gelchromatographie

Die Immunglobuline wurden aus vorgereinigten Lösungen an Säulen mit Sephadex G 2oo im Aufwärtschromatographieverfahren gereinigt (WIRTH et al.1965, DETERMANN 1967,

DENGLER und CHIAVARRA 1971, NIEDERWIESER und PATAKI 1973). 19-S-Makromoleküle wurden an Sepharose 6 B isoliert (SCHUMACHER 1966, HELD und KALLEE 1968, ULLMANN und HESS 1968, TICHY et al.1972, VAN DER HOVEN et al.1973). Füllhöhe der G-200-Säulen 90-97 cm bei V_t= 440-480 ml, Probevolumen V_s= 10-35 ml (5-8 % von V_t) mit Proteingehalt 2-5 g/dl und Eiweißmenge 500-1000 mg. Elutionsmittel war o,o8 oder o,1 M Ammoniumbicarbonat. Die Durchflußgeschwindigkeit (f= o,1-o,25 ml/min) hing ab vom durchflußwirksamen Druck (10-20 cm H_2O). Kontrollen und Reinheitsprüfungen erfolgten wie bei der IEC, die immunelektrophoretisch reinen Fraktionen wurden dialysiert und lyophilisiert.

2. Protein-Bestimmungsmethoden

2.1 Stickstoffbestimmung nach KJEHLDAL

Verdünnungsreihen von IgG und IgM wurden nach der Mikromethode von PARNAS und WAGNER (1921) untersucht in der Dampfdestillationsanlage nach PREGL. Dabei kamen Modifikationen von ROBINSON et al.(1937), CHIBNALL et al.(1943) sowie von MILLER und HOUGHTON (1945) zur Anwendung. Nach den Vorschlägen von HOPPE-SEYLER und THIERFELDER (1953) wurde der Bereich der Stickstoff-Konzentration eingestellt auf Werte zwischen o,o2 und o,4 g/dl (o,o3-o,5 mg N/ml). Der Eiweißgehalt der niedrigsten und höchsten Verdünnungsstufen war um den Faktor 10 verschieden. In insgesamt 12 Untersuchungsreihen gab es je 8 Verdünnungsstufen. Alle Meßwerte wurden doppelt bestimmt.

Als Katalysator diente Selendioxid nach BRAADSTREET (1940) in dem Reaktionsgemisch von WIENINGER. Die Veraschung erfolgte mit konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze. Die Vorlage zum Auffangen des Destillats enthielt Borsäure und Mischindikator nach SHER (1955).

Je 30 ml gesammeltes Destillat wurden mit o,o1 N HCl titriert (indirekte Acidimetrie nach SOBEL et al.(1937) bis zum Farbumschlag von grün nach violett). 1 ml HCl entspricht o,14 mg Stickstoff; 1mg Stickstoff 6,25 mg Protein (BRAND et al.1944, ARMSTRONG et al.1947, EGGSTEIN und KREUTZ 1955).

2.2 Trockengewichtsbestimmung

Als Vergleichsmethode zur Stickstoffbestimmung nach KJEHLDAL diente die Untersuchung des Eiweiß-Trockengewichts, wie sie ROBINSON und HOYDEN (1941) beschrieben. Das Protein wird mit Ammonsulfat gefällt, im kochenden Wasserbad koaguliert und der Niederschlag in einem Papierfilter aufgefangen, der nach Trocknung gewogen wird. Die Methode erlaubt eine Standardisierung der KJEHLDAL-Ergebnisse.

2.3 Biuret-Gesamteiweiß-Bestimmung

Die von WEICHSELBAUM (1946) angegebene Technik wurde nach der Modifikation von FRANK und KOECHER (1950) durchgeführt. Standardserum war "Lab Trol" der Firma DADE, Miami. Die Proteinkonzentrationen der untersuchten Lösungen wurden auf o,5 bis 15 g/1oo ml eingestellt. Niedrigste und höchste Verdünnungsstufe unterschieden sich um den Faktor 10 oder 20. Der Eiweißgehalt lag um das 40- oder 50-fache über der Konzentration der nach KJEHLDAL untersuchten Lösungen. Alle Werte wurden durch Doppel-, Dreifach- oder Vierfachbestimmungen ermittelt. Die Ergebnisse wurden an Hand einer Eichkurve berechnet.

2.4 Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie

Elektrophoresekammer "Mikrophor", Boskamp, Bonn
Verstärker, Trägerbrücken, Auftragstempel
Celluloseacetatfolie Sartorius, Göttgn.

Die Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie ist beschrieben von KOHN (1957,1958,1968), FRIEDMAN (1961) sowie von MULLAN et al.(1962). Die Verwendung von Na-Barbiturat-Puffer mit pH 8,6 und Ionenstärke o,1 entspricht dem Vorgehen bei der Immunelektrophorese, ebenso die Färbung mit 2 % Amidoschwarz in einer 9:1 Methanol/Eisessig-Lösung (diese diente auch zur Entfärbung). Die Folientransparenz wurde mit 7:3 Dioxan/Isobutanol erreicht. Die Extinktionspeaks wurden über Integralschreiber und Rechner ausgewertet.

Die untersuchten Lösungen wurden in definierten Verdünnungsstufen aus gleichkonzentrierten Stammlösungen von Immunglobulin und Albumin hergestellt, insgesamt gab es pro Bestimmungsansatz 16 unterschiedliche Lösungsgemische. Das Verhältnis der Proteinanteile - 1:1, 1:2, 1:4 oder 1:8 - ist als Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung zu erwarten, sofern die Proteine durch die Methode in gleicher Weise erfaßt werden (Abb.1).

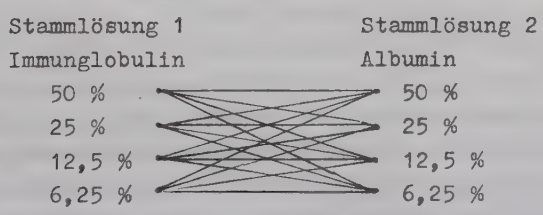

Abb.1: Schema der Zusammensetzung der Albumin-Immunglobulin-Mischlösungen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Stammlösung im Lösungsgemisch an.

Mit den dargestellten Lösungsgemischen wurde nicht nur die Richtigkeit der Elektrophoresetechnik, sondern auch das Ausmaß der Differenz zwischen Elektrophorese-Biuret-Werten (EBP) und den Ergebnissen der RID untersucht.

2.5 Immunelektrophorese

Elektrophoresekammer, Verstärker	Camag, Muttens
Monospezifische Antiseren	Behringwk.Marburg
Anti-Human-Serum	Inst.Pasteur,Paris

Die Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953) wurde in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER (1955) durchgeführt. Auftraglöcher in 2% Agargel wurden mit 3-5 µl Antigen eben gefüllt. Die Elektrophorese lief mit einer Spannung von 5 V/cm in Na-Barbiturat-Puffer (pH 8,6; Ionenstärke o,15) über einen Zeitraum von 100-120 min. Dann wurden die Antiserumrinnen mit je 50 µl Lösung gefüllt. Nach Diffusionsende wurde in o,5 % Azokarminlösung gefärbt. Auf jedem Objektträger wurde ein Normal-Kontrollserum mitgeführt.

2.6 Einfache radiale Immundiffusion (RID)

Für die von MANCINI et al.(1965) eingeführte Technik wurden handelsübliche Immundiffusionsplatten verwendet (Tri-Partigen, Behringwerke Marburg). Das Probevolumen betrug 5 µl, die Ag-Konzentration o,2- 5 mg/ml. Untersucht wurden dieselben Verdünnungen wie bei der KJEHLDAL-Bestimmung, alle Werte wurden dreifach bestimmt. Die Präzipitatdurchmesser wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Diffusion mit Hilfe einer Meßlupe (o,1-mm-Skala, Bausch & Lomb) abgelesen. Die Differenz der Messung in 2 Ebenen durfte o,1 mm nicht überschreiten, sonst wurden die Werte eliminiert. Die Berechnung der Immunglobulin-Konzentration erfolgte nach Quadrierung der Präzipitat-Durchmesser an Hand einer linearen Standardkurve mittels eines Rechners.

3. Statistische Methoden

3.1 Fehlerrechnung (SACHS 1974)

Richtigkeit (accuracy) : Die Abweichung $F = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} \cdot 100\ \%$ wird als methodischer oder systematischer Fehler bezeichnet (μ = Mittelwert der Ergebnisse der Standardmethode, $\bar{x}$ = Mittelwert der Bestimmungen der zu vergleichenden Methode).

Genauigkeit (Reproduzierbarkeit, precision) : Zur Erfassung des zufälligen Fehlers einer Methode dient der Variationskoeffizient $V = s/\bar{x} \cdot 100\ \%$ (s = Standardabweichung). Zu beachten ist, daß nicht der relative Variationskoeffizient V_r angegeben wird ($= V/\sqrt{(n-1)}$, dessen Betrag erheblich niedriger liegt.

Gesamtfehler : Unter der Bedingung annähernd normalverteilter Meßwerte kann die Summe aus zufälligem und systematischem Fehler einer Methode angegeben werden als Gesamtfehler $G = \frac{|\bar{x} - \mu| + 2s}{\mu} \cdot 100\ \%$.

3.2 Signifikanztests (LORENZ 1972, SACHS 1974)

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgt mit dem Chi-^{2}-Anpassungstest. Im Fall der Normalverteilung der Meßwerte und der Übereinstimmung ihrer Standardabweichungen (Prüfung mit dem Varianzquotienten-Test nach FISHER) wird zur Signifikanzprüfung der T-Test eingesetzt. Treffen die Voraussetzungen nicht zu, so werden als verteilungsfreie Verfahren der U-Test von MANN und WHITNEY bzw. der WILCOXON-Paardifferenztest angewandt. Als Signifikanzniveau wird im zweiseitigen Test $p = 0{,}05$ angenommen, als hochsignifikant Unterschiede mit $p < 0{,}01$ betrachtet.

3.3 Lineare Regression und Korrelation

Die Berechnung des Regressionskoeffizienten, des Korrelationskoeffizienten sowie der Standardabweichungen

erfolgte nach den üblichen Gleichungen (CAMPBELL 1971, SACHS 1974). Zur Berechnung wurden Programme erstellt, die sämtliche Prüfgrößen in einem Arbeitsgang ermittelten. Die folgenden Parameter werden zum Methodenvergleich an verschiedenen Stellen der vorliegenden Arbeit angegeben :

b = Regressionskoeffizient zur Beschreibung der Steigung der Regressionsgeraden.

a = y-Achsenabstand der Regressionsgeraden bei x = 0. Ist a = 0, so verläuft die Gerade durch den Nullpunkt des Achsenkreuzes.

s_b = Standardabweichung des Regressionskoeffizienten.

$s_{y.x}$ Standardabweichung des vom x-Wert abhängigen y unter Ausschluß der Schwankungen des x-Wertes.

s_b erlaubt eine Aussage über das Ausmaß der Rotation der Regressionsgeraden um ihren Mittelwert $(\bar{x},\bar{y})$. $s_{y.x}$ gibt Auskunft über die mögliche Verschiebung der Regressionsgeraden auf der y-Achse. Aus beiden Werten können die Vertrauensgrenzen der Regressionsgeraden bestimmt werden.

ERGEBNISSE

1. Reindarstellung der Immunglobuline

1.1 Vorreinigungen

Ammonsulfatfällung: Die Anreicherung von IgG und IgA wurde durch Fällung in 40 % Ammonsulfatlösung erreicht. Ein IgG - Verlust entstand dabei nicht, IgA fiel nur zu 80 % aus. Der Albuminanteil im Niederschlag betrug 1/3 bis 1/6 des Ausgangswertes. Bei IgM - Fällung bedurfte es eines Ammonsulfatgehaltes von 50 %, um IgM - Verlust zu vermeiden. Bei 40 % $(NH_4)_2SO_4$ fielen nur 2/3 des IgM aus.

Euglobulinfällung: Durch Herabsetzen der Ionenstärke in Seren kam es zur Ausfällung der IgM - reichen Euglobuline. In den vorsichtig abzentrifugierten Niederschlägen betrug die IgM - Konzentration mehr als das Doppelte des Ausganswertes, der Albumingehalt verminderte sich auf die Hälfte.

Gelfiltration: Bei der Abtrennung der Sulfationen aus dem Ammonsulfat-Präzipitat zeigte sich, dass an der Sephadex-G-25-Gelsäule (h = 35 - 40 cm) das optimale Probevolumen V_s 25 % des Gelbettvolumens V_t betrug. Bei diesem Verhältnis wurde Eiweiß und Salz vollständig getrennt, die Elutions-Peaks hatten minimalen Abstand und das Protein wurde praktisch nicht verdünnt.

1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Säulenchromatographie: IgG wurde in ca. 20 Chromatographieläufen aus Eluat der G 25-Gelfiltration an DEAE-Sephadex A 50 dargestellt. Das Elutionsdiagramm (Abb. 2) ergab sich nach Anlegen eines linear-kontinuierlichen Gradienten aus Tris-HCl-Puffer (KNEDEL und FATEH-MOGHANDAM 1968). Die lineare Zunahme der Ionenstärke wurde durch quantitative Chlorid-Bestimmung nach MOHR (JANDER et al. 1966) festgestellt.

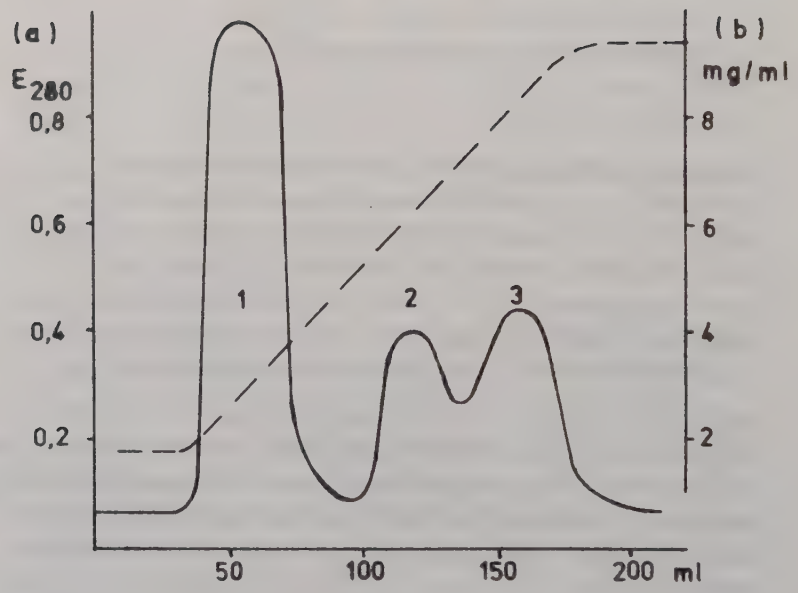

Abb. 2: Elutionsdiagramm nach Auftragen IgG-reicher Lösungen auf DEAE-Sephadex A50 (a). Abszisse: Eluiertes Volumen, Ordinate: Extinktion bei 280 nm. 1. Peak: IgG, 2. Peak: Transferrin, 3. Peak: Albumin u. a. In (b) ist der Anstieg der Chlorid-Konzentration durch den kontinuierlichen Gradienten des Tris-HCl-Puffers dargestellt. Startpuffer SP o,o5 M mit pH 8,0; Grenzpuffer GP o,5 M mit pH 4,5. Säulendurchmesser d = 2 cm, Gelhöhe h = 20-25 cm, Gelvolumen V_t 1oo-125 ml, die Probe enthielt o,3-1,2 g Eiweiß in 8-4o ml Startpuffer.

Eine Abtrennung des M-Gradienten vom polyklonalen IgG war wegen der identischen elektrophoretischen Eigenschaften nicht möglich.

Zur IgG-Isolierung unter stufenweiser Erhöhung der Ionenstärke wurde ein Ammoniumbicarbonatpuffer benutzt (I = o,o1 bis o,5). Unvorbehandeltes Serum (bis zu 15 % von V_t) wurde aufgetragen. Der IgG-Peak trat bei I = o,o2 bis o,o4 auf. Die Reinheit war um so größer, je niedriger die Ionenstärke bei der Elution war.

IgA wurde im ersten Reinigungsschritt an DEAE-Sephadex A 5o chromatographiert. Puffer war Kaliumphosphat (KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,5) mit SP o,o1 M und GP o,5 M. Das Elutionsdiagramm zeigte 4 Peaks, zuerst einen IgG-, dann einen nicht reinen IgA-Gipfel, der insbesondere noch Transferrin enthielt. Die Weiterreinigung erfolgte an Kationenaustauscher CM-Sephadex C 5O mit dem gleichen Puffer. Die Profile der auf diese Weise erhaltenen Elutionsdiagramme wechselten mit der Zusammensetzung der aufgetragenen Lösungen. Der erste Peak enthielt u. a. immer Albumin, der zweite Transferrin, das sich gut von IgA trennen ließ. Im dritten Gipfel war IgA entweder immunelektrophoretisch rein oder in ungünstigen Fällen nicht ganz vom IgG des vierten Peaks getrennt.

Bei der IgM-Darstellung war ein NaCl-Zusatz im Tris-HCl-Puffer erforderlich, um Denaturierung und Ausflockung der Makroglobuline zu verhindern. Nach dem Vorschlag von ULLMANN und HESS (1968) wurde Tris und NaCl aequimolar eingewogen (SP je o,o5 M, GP je o,5 M, pH konstant 8,o ohne pH-Gradient). Bei ca. 3o Trennungen in Säulen mit 25-4o cm Füllhöhe wurden Proben aus der G-25-Gelfiltration in Volumina von 1o-2o % des Gelvolumens aufgetragen (Eiweißkonzentration 2,5 bis 4 g/1oo ml). Die IgG-Elution begann wegen der hohen Ionenstärke des Start-Puffers schon unter Startbedingungen bis zum 1. Peak. Im ansteigenden Schenkel des 2. Gipfels wurde IgM zum Teil immunelektrophoretisch rein eluiert, gefolgt von Transferrin.

Bei zwei Seren gelang eine gute Vorreinigung des monoklonalen IgM an DEAE-Sephadex A 25 (Puffer, Säulenfüllung und Probe wie oben ; Abb.3).

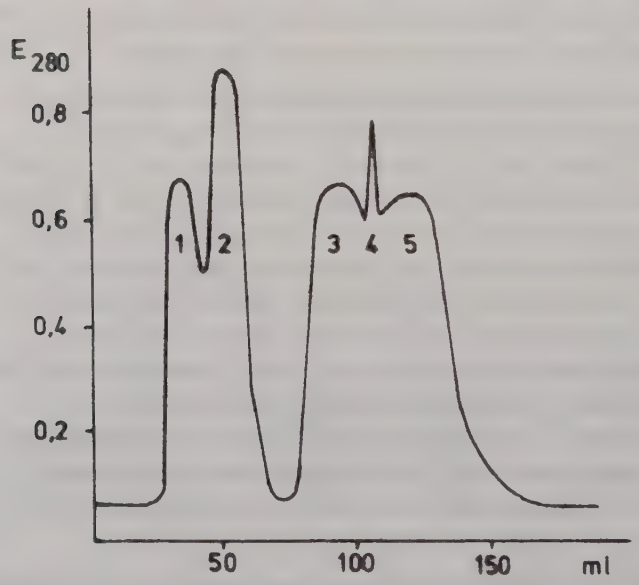

Abb.3: Elutionsdiagramm von IgM-reichen Lösungen an DEAE-Sephadex A 25. 1.Peak: IgG, 2.Peak: IgM (im ansteigenden Schenkel mit IgG verunreinigt), 3.Peak: Transferrin, 4.Peak: Coeruloplasmin (nicht rein), 5.Peak: Albumin u.a.

Der IgM-Peak enthielt als Verunreinigung etwas IgG und Alpha-2-Makroglobulin. Eine Eiweißverdünnung trat im Gegensatz zur IEC an A-50-Gel nicht ein. Peak 4, eine sichtbar blaue Fraktion, bestand immunelektrophoretisch hauptsächlich aus Coeruloplasmin.

Batch-Verfahren: Die IgG-Isolierung im Becherglas nach BAUMSTARK et al.(1964) brachte bis zu o,5 g reines IgG in einem Doppelansatz aus 50 ml eines Serums mit M-Gradienten (Ausbeute ca. 30 %). Der M-Gradient wanderte

in diesem Fall so weit kathodenwärts, daß er vom normalen IgG abgetrennt wurde. Die Trennleistung des Batch-Systems war abhängig von den Ioneneigenschaften des zu isolierenden Immunglobulins: Aus 50 ml Normalserum wurden 100-200 mg reines IgG gewonnen (Ausbeute 15-30 %). Ein Serum mit 52 % Gammaglobulin (monoklonales IgG) erbrachte nur 20 - 100 mg (< 3 %) eines polyklonalen IgG (der elektrophoretisch im Beta-Bereich wandernde M-Gradient ließ sich nicht rein darstellen).

1.3 Gelchromatographie

Der letzte Reinigungsschritt bei der Isolierung von IgG und IgA war die Gelchromatographie an Sephadex G 200 (DETERMANN 1967, LESLIE und CLEM 1969), bei der IgM-Darstellung an Sepharose 6 B (Tab.2).

Gel	Sephadex G 200	Sepharose 6 B
Säule	2,5 • 100 cm	2,o • 70 cm
Gelhöhe h	72 - 96 cm	58 - 63 cm
Gesamtvolumen V_t	350 - 470 ml	180 - 200 ml
Ausschlußvolumen V_o	130 - 150 ml	40 - 50 ml
Probevolumen V_s	3 - 42 ml	6 - 20 ml
V_s / V_t	1 - 12 %	3 - 10 %
Proben-Eiweiß-Konz.	2,1 -4,4 g/dl	1,4 - 7 g/dl
Proben-Eiweißmenge	100 - 1300 mg	2oo - 700 mg
Durchflußwirks. Druck	10 - 20 cm H_2O	60 -120 cm H_2O
Durchflußrate f	o,15 -o,3 ml/min	o,5 -o,8 ml/min
Verdünnungsfaktor	1,2 -10(1,4-1,9)	5 - 6
Elutionsvolumen V_e	170 - 200 ml bis 7-S-Peak	70 ml bis 19-S-Peak
V_e / V_t	o,35 - o,45	o,35 - o,4
V_e / V_o	1,2 - 1,25	1,4 - 1,75

Tab.2: Parameter der Gelchromatographiesäulen mit Sephadex G 200 und Sepharose 6 B

Die Elution reiner Immunglobuline war abhängig von der Gelhöhe, der Homogenität des Gelbetts, der Probenzusammensetzung (möglichst hoher Immunglobulin-Anteil) und dem Probevolumen V_s (unter 10 % von V_t). Abb.4 und 5 zeigen die Elutionsdiagramme verschiedener Lösungen von 7-S-Globulinen.

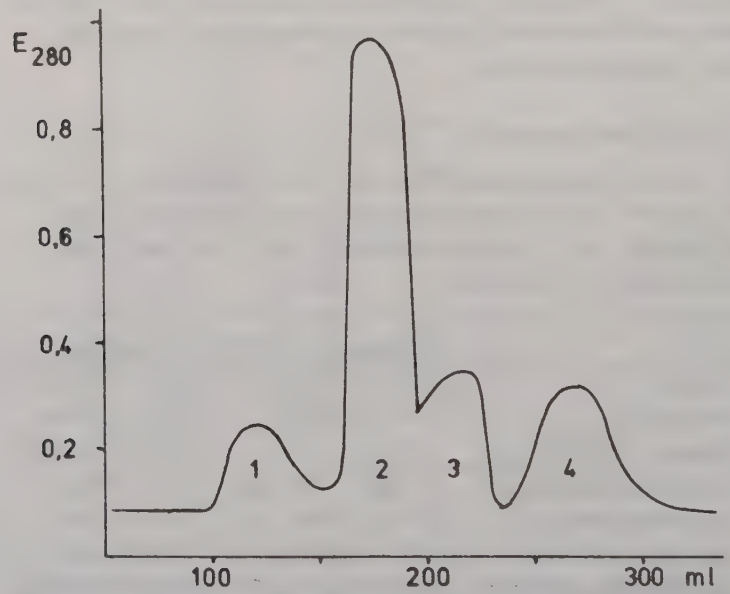

Abb.4: Elutionsdiagramm einer mit Ammonsulfatfällung vorbehandelten Lösung von monoklonalem IgG, chromatographiert an Sephadex G 200. Säulenhöhe 90 cm, V_s=30 ml. Peak 1 enthält Makroglobuline, 2 die 7-S-Globuline (hier reines IgG im aufsteigenden Schenkel und Gipfel), Peak 3 überwiegend Transferrin und 4 hauptsächlich Albumin.

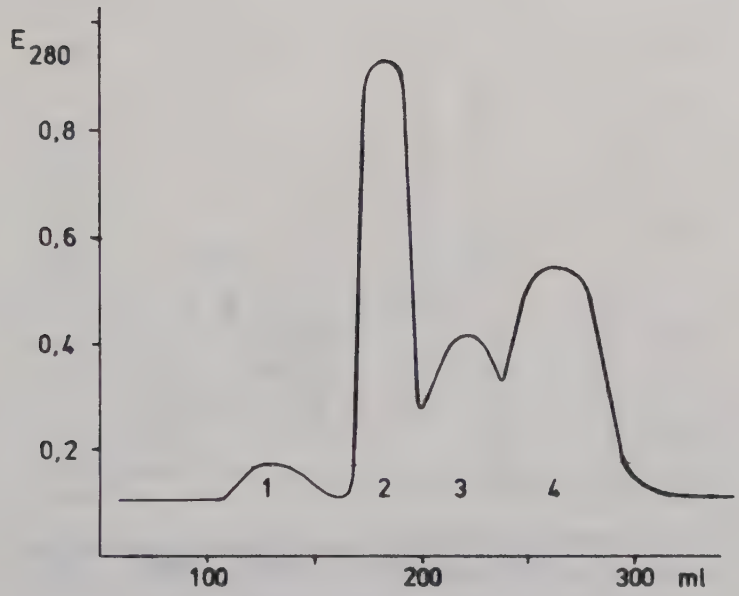

Abb.5: Elutionsdiagramm einer an DEAE-Sephadex A 50 vorbehandelten Lösung von monoklonalem IgA. h = 95 cm, V_s= 28 ml. In Peak 1 sind 19-S-Globuline, in 2 vorwiegend IgA mit einer Spur IgG, in 3 und 4 hauptsächlich Transferrin bzw. Albumin nachzuweisen.

Beim Versuch, IgM an Sephadex G 200 zu isolieren, kam keine Abtrennung des Alpha-2-Makroglobulins zustande, da beide im Ausschlußvolumen eluiert wurden. Deshalb wurde die IgM-Endreinigung an Sepharose 6 B vorgenommen. Die in Tab.2 angegebenen Säuleneigenschaften sind aus 40 Chromatographieläufen ermittelt. Abb.6 zeigt die Elution von IgM aus vorbehandelter Lösung.

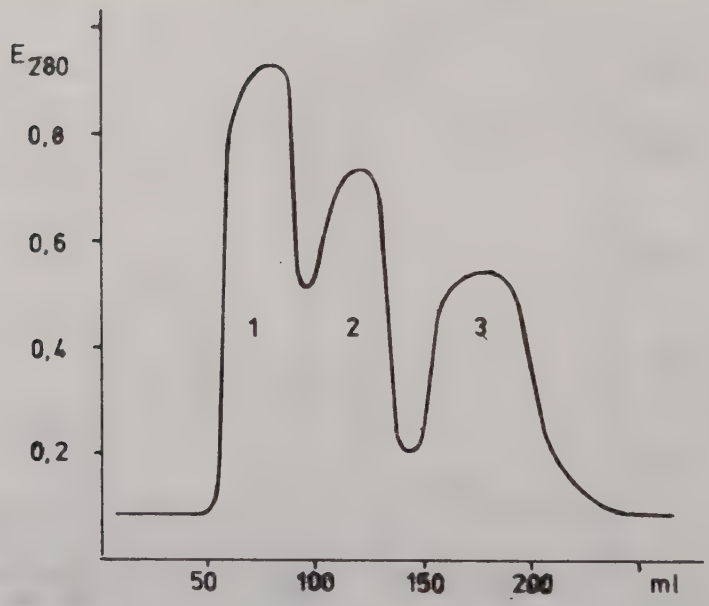

Abb.6: Elutionsdiagramm einer durch Euglobulinfällung angereicherten Lösung von monoklonalem IgM, chromatographiert an Sepharose 6 B. h = 60 cm, V_s= 12 ml. Peak 1 enthält im ansteigenden Schenkel und Gipfel reines IgM (im abfallenden Schenkel mit Alpha-2-Makroglobulin). Peak 2: IgG, 3: Transferrin, Albumin u.a.

2. Protein-Bestimmungsmethoden

2.1 Stickstoffbestimmung nach KJEHLDAL

Das Verhältnis titrierter HCl-Lösung zur vorgegebenen Eiweißkonzentration wurde über den gesamten Verdünnungsbereich - höchste und niedrigste Verdünnungen unterschieden sich um den Faktor 10 - als exakt linear gefunden (Abb.7).

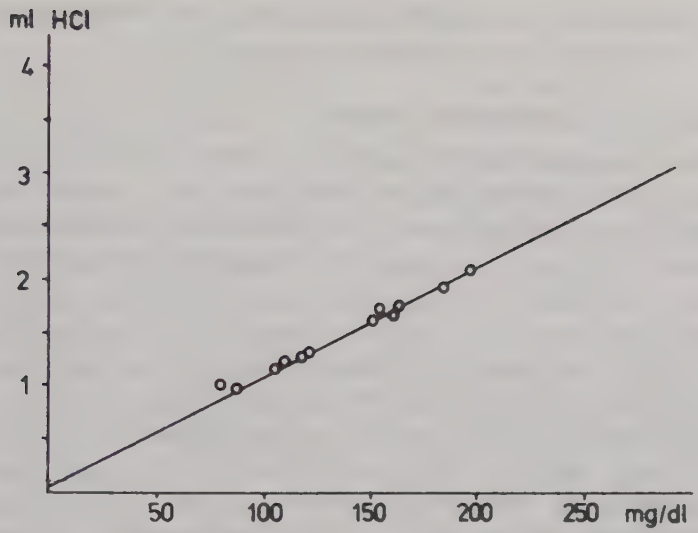

Abb.7: Lineare Regression für KJEHLDAL-Bestimmungen. Abszisse: Vorgegebene Proteinkonzentration, Ordinate: bei Titration verbrauchte Menge von o,o1 N HCl.

Bei niedrigem Eiweißgehalt nahm die relative Meßgenauigkeit ab. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor zeigten die Einzelwerte größere Schwankungen als bei gering verdünnten Lösungen. IgG und IgM unterschieden sich praktisch nicht in den Ergebnissen. Die Parameter der linearen Regression sind in Tab.3 zusammengestellt.

Regressionskoeffizient	$b = o,98 - 1,14 \cdot 10^{-2}$
y-Achsenabstand	$a = -1,6 - +9,o \cdot 10^{-2}$
Standardabweichg.von b	$s_b = o,65 - 1,7 \cdot 10^{-3}$
Stand.abw. des abh. y	$s_{y.x} = 2,6 - 6,o \cdot 10^{-2}$
Methodenfehler F	F = 2,7 %
Variationskoeffizient	V = 3,2 %
Gesamtfehler G	G = 8,9 %

Tab.3: Werte der linearen Regression und Methodenqualität für KJEHLDAL-Bestimmungen. Angegeben sind niedrigste und höchste Ergebnisse der Untersuchungen.

Der Variationskoeffizient zeigt eine hohe Methodengenauigkeit an. Der Gesamtfehler ist gering.

2.2 Biuret-Protein-Bestimmung

Extinktionszunahme und Anstieg des Eiweißgehaltes waren bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 10 g/1oo ml genau linear proportional. Die Regressionsgerade führte exakt durch den Nullpunkt. Bei höheren Konzentrationen nahm die Extinktion nicht mehr proportional zur Erhöhung des Eiweißgehalts zu, sondern ergab zu niedrige Werte (Abb.8). Das Ausmaß des Fehlers wechselte mit der Zeit, welche die Probe vor der Messung nach Zugabe des Reaktionsgemisches stand, wobei die Fehlergröße reziprok zur Zeitdauer war. Nach Standzeiten von 30 min. wurden bei verschiedenen Bestimmungsreihen um 10 bis 15 % zu niedrige Ergebnisse festgestellt (z.B. 12,5 g Eiweiß/1oo ml gegenüber einem KJEHLDAL-Wert von 14 g/1oo ml). Nach einer Standzeit von 20 Stunden war kein Fehler mehr nachweisbar.

Für die Berechnung der linearen Regression wurden Proteinkonzentrationen über 10 g/1oo ml ausgeschlossen (Tab.4).

b = 26,5 - 28,9	F = 2,o %
a = -o,9 - 5,7	V = 5,5 %
s_b = o,20 - o,86	G = 13,1 %
$s_{y.x}$ = 1,4 - 7,1	

Tab.4: Parameter der linearen Regression und Methodenqualität für die Biuret-Protein-Bestimmung unter Ausschluß von Konzentrationswerten über 10 g/1oo ml. Angegeben sind niedrigste und höchste Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen. Eine Begriffserklärung findet sich in Tab.3 sowie unter "Statistische Methoden" S.13.

Bezieht man die Extinktionswerte hochkonzentrierter Lösungen in die Berechnung der Regressionsgerade mit ein,

so sind deren Varianzen wesentlich höher und sie verläuft nicht durch den Nullpunkt. Dann ergeben verschiedene Verdünnungsstufen nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor unterschiedliche Werte für die Stammlösung. Dagegen läßt sich nach der Gerade in Abb.8 ein einheitlicher Konzentrationswert der Stammlösung aus den verschiedenen Verdünnungsstufen berechnen. Die Fehlerbreite der Biuret-Methode ist nach Tab.4 sehr gering.

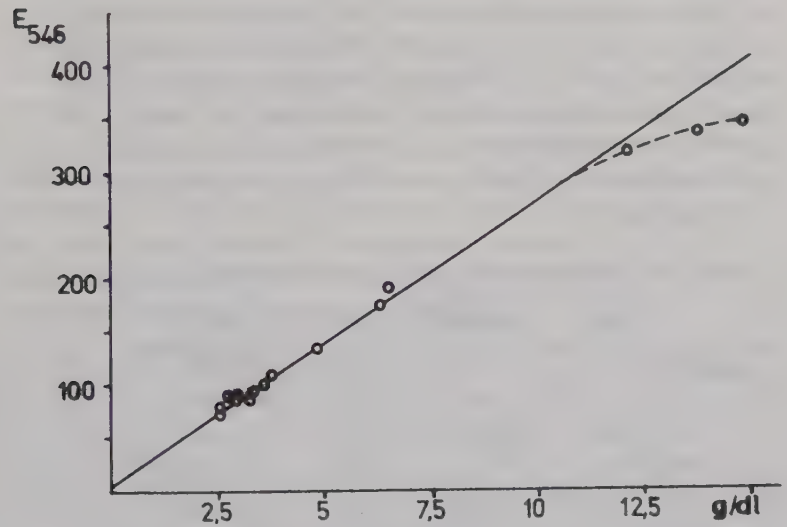

Abb.8: Lineare Regression für Biuret-Protein-Bestimmungen. Abszisse: Eiweißkonzentration, Ordinate: Extinktion bei 546 nm. Das Schaubild zeigt die Regressionsgerade (errechnet unter Ausschluß von Konzentrationswerten über 10 g/1oo ml) sowie die Abweichung der Extinktion von der Geraden im oberen Konzentrationsbereich (gestrichelte Linie).

2.3 Vergleich von Trockengewicht, KJEHLDAL- und Biuret-Ergebnissen

Die Werte der Lyophilisat-Einwaagen wichen von denen der übrigen Methoden erheblich ab (Tab.5), weshalb sie bei der vergleichenden Zusammenstellung nicht ausgewertet wurden. Die nach ROBINSON und HOYDEN (1941) bestimmten Eiweiß-Trockengewichte zeigten dagegen mit KJEHLDAL- und Biuret-Ergebnissen gute Übereinstimmung. Die Trockengewichtsbestimmung erwies sich als sehr genaue Methode, in Fünffachuntersuchung wurde ein Variationskoeffizient von nur 1,6 % ermittelt. Die KJEHLDAL-Werte lagen durchschnittlich um 2,7 % unter den Trockengewichten. Wurde statt des Umrechnungsfaktors Stickstoff zu Eiweiß von 6,25 der von SUNDERMAN et al.(1958) vorgeschlagene Wert 6,54 eingesetzt, so waren die KJEHLDAL-Ergebnisse um 2,2 % zu hoch.

	Lyoph.-Einwg.	Trocken-gewicht	KJEHLDAL	Biuret
IgG-Le	-	-	14,27	14,33
"	-	-	13,44	13,92
"	13,o	12,43	12,3o	12,67
-Ra	7,5	-	8,83	8,46
"	14,o	13,4o	13,14	13,85
-Hö	-	-	14,2o	14,66
-NS	-	-	13,95	14,3o
IgM-Vö	-	-	14,54	14,46
"	12,74	12,1o	11,48	11,95
-Li	-	-	14,25	14,64
"	11,06	-	10,21	10,25
-Al	13,57	-	13,01	13,05

Tab.5: Ergebnisse der Lyophilisat-Einwaage, des Eiweiß-Trockengewichts sowie der Mittelwerte der auf die Stammlösung umgerechneten Proteinkonzentrationen von KJEHLDAL- und Biuret-Untersuchungen (in g/1oo ml).

Die Wertepaare aus KJEHLDAL- und Biuret-Bestimmungen lagen nach Multiplikation der KJEHLDAL-Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor 40 oder 50 nahe beieinander. Der Regressionskoeffizient betrug beim Wertevergleich 1,02 für IgG und 1,03 für IgM (Mittelwert 1,02). Die Regressionskoeffizienten bei den einzelnen Untersuchungen schwankten zwischen o,98 und 1,05. Vom Erwartungswert 1 unterschieden sich die meisten Koeffizienten signifikant. Die Regressionsgeraden verliefen im Mittel durch den Nullpunkt (a für IgG = +o,o5, für IgM = -o,o7). Biuret-Werte über 10 g/1oo ml blieben unberücksichtigt. Die Biuret-Ergebnisse lagen durchschnittlich um 2,o % über den KJEHLDAL-Werten. Dieser Unterschied ist nach dem WILCOXON-Paardifferenztest signifikant. Trotzdem ließen sich die Ergebnisse von Biuret- und KJEHLDAL-Bestimmung gut vergleichen. Bei Untersuchung von IgG und IgM gab es keine signifikanten Differenzen, weshalb in Abb.9 für alle KJEHLDAL-Biuret-Wertepaare nur eine mittlere Regressionsgerade dargestellt wird.

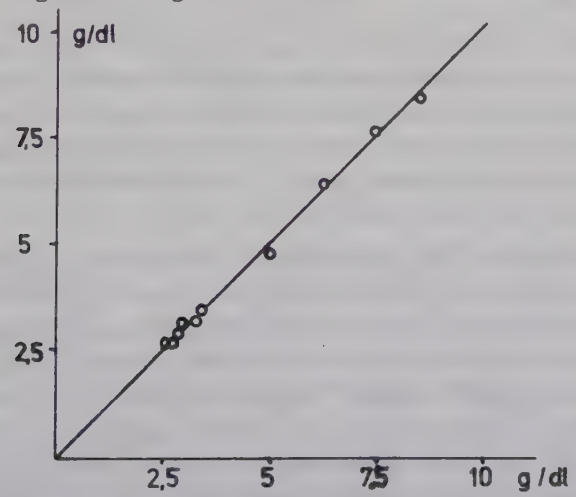

Abb.9: Regressionsgerade aller Wertepaare von Biuret- und KJEHLDAL-Bestimmungen (letztere mit Faktor 40 oder 50 multipliziert). Abszisse: KJEHLDAL-, Ordinate: Biuret-Ergebnisse. b = 1,02; a = 0; s_b = o,o3; $s_{y.x}$ = o,16.

2.4 Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der im Methodenteil beschriebenen Mischlösungen von Immunglobulin und Albumin wurde deutlich, daß die Gamma-Globuline bei der Amidoschwarz-Färbung einen relativ zu geringen Farbstoffanteil aufnehmen. Dabei spielte die Protein-Zusammensetzung und -Konzentration eine gewisse Rolle (Tab.6 und 7, Abb.10 und 11). Dagegen war das Ergebnis unabhängig davon, ob die Elektrophorese im normalen Spannungsfeld oder in Reverse-Flow-Technik ausgeführt wurde.

Eingewogenes IgG bzw. IgM	Elektrophorese-Ergebnisse: γ-Glob.(IgG)	γ-Glob.(IgM)
11,1 %	8,o %	5,o %
20,o %	15,o %	11,o %
33,3 %	26,5 %	21,o %
50,o %	39,5 %	34,5 %
66,7 %	56,5 %	54,o %
80,o %	72,o %	72,o %

Tab.6: Eingewogener Immunglobulinanteil im Vergleich zum elektrophoretisch ermittelten Gamma-Globulingehalt (Mittelwerte) in Lösungen, die nur IgG bzw. IgM und Albumin enthielten. Die absoluten Eiweißkonzentrationen sind nicht berücksichtigt (die EBP-Werte der Gamma-Globuline lagen zwischen o,8 und 9,6 g/1oo ml).

Der Unterschied der Anfärbung gleichkonzentrierter IgG- und IgM-Lösungen ist deutlich, wenn auch im MANN-WHITNEY-Test nicht signifikant. Die Elektrophorese erfaßte im Mittel nur 80 % des IgG und nur 68 % des IgM. Diese Werte schwankten stark mit der Zusammensetzung der Lösung: Bei niedrigem Globulin- und hohem Albumingehalt war der elektrophoretische Gammaglobulin-Anteil im Verhältnis zur Immunglobulin-Einwaage geringer (IgG 72 %, IgM 45 %) als bei Globulinanteilen, die Albumin weit überwogen, wo die Elektrophorese 90 % des "wahren" IgG oder IgM anzeigte.

Lösungsansatz Immunglob./Albumin	Gamma-Glob. /IgG	Gamma-Glob. /IgM
1 : 8	72 %	45 %
1 : 4	75 %	55 %
1 : 2	79 %	63 %
1 : 1	79 %	69 %
2 : 1	85 %	81 %
4 : 1	90 %	90 %
Mittelwert	80 %	68 %

Tab.7: Verhältnis des elektrophoretisch ermittelten Gammaglobulin-Anteils zum eingewogenen Immunglobulin (Mittelwerte). Untersucht wurden Lösungen aus Rein-IgG bzw. -IgM und Reinalbumin in verschiedenen Mischungsverhältnissen.

In Abb.10 sind die Ergebnisse von Tab.6 graphisch dargestellt.

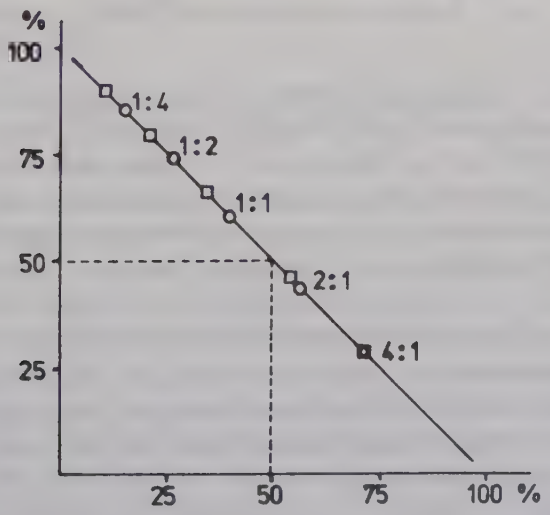

Abb.10: Vergleich von Einwaage und Elektrophorese-Ergebnissen in Albumin-Immunglobulin-Mischlösungen. Abszisse: Gamma-Globulin-, Ordinate: Albuminanteil der Elektrophorese. Die Zahlen an den Meßpunkten geben das eingewogene Mischungsverhältnis der gelösten Proteine an (o = IgG, □ = IgM).

Abb.11 zeigt das Elektrophorese-Ergebnis bei Untersuchung von Lösungen mit gleichem Immunglobulin- und Albumingehalt in verschiedenen Konzentrationsstufen. Die Werte müßten auf der 50-%-Horizontalen liegen. In Wirklichkeit erreichen sie für IgG maximal 43 %, für IgM nur bis zu 34 %.

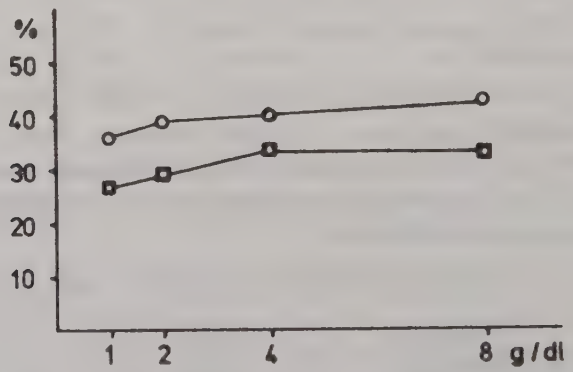

Abb.11: Bei elektrophoretischer Untersuchung gefundener prozentualer Anteil von IgG bzw. IgM in verschieden konzentrierten Lösungen mit einwaagegleichem Gehalt von Immunglobulin und Albumin. Abszisse: Immunglobulin-Konzentration, Ordinate: elektrophoretischer Gamma-Globulinanteil (o = IgG, □ = IgM).

2.5 Einfache radiale Immundiffusion (RID)

Die Untersuchungen wurden aus denselben Verdünnungen vorgenommen wie die KJEHLDAL-Bestimmungen. Im folgenden werden die Faktoren beschrieben, deren Einfluß auf die RID-Methode geprüft wurde.

Diffusionszeit: Die Proportionalität zwischen Immunglobulin-Konzentration und Präzipitatfläche ist stark zeitabhängig. Bei genügend langer Diffusionszeit ließ sich die Linearität der Beziehung bis zu Antigenkonzentrationen nachweisen, die doppelt so hoch waren wie die höchstkonzentrierte

Standardlösung des Plattenherstellers[1]. IgG konnte bis zu einer Konzentration von 350 mg/1oo ml, IgM sogar bis zu 600 mg/1oo ml exakt bestimmt werden (Abb.12 und 13).

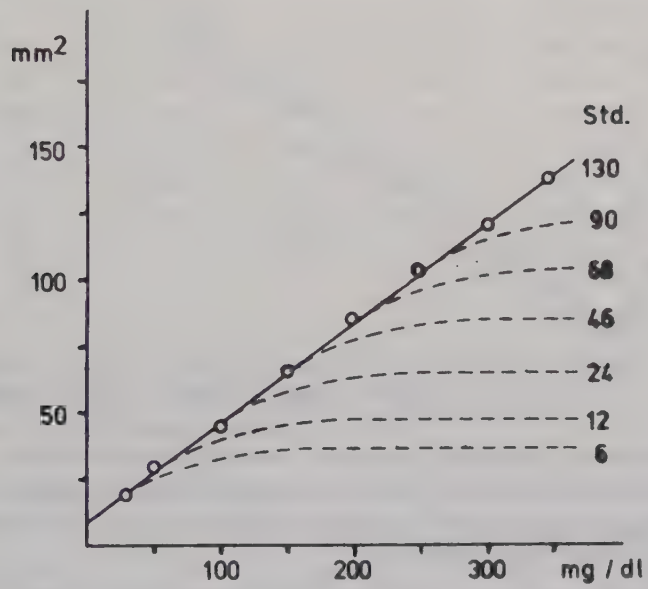

Abb.12: Beziehung zwischen Immunglobulin-Konzentration und Präzipitatfläche in Abhängigkeit von der Diffusionszeit (bei 22°C). Abszisse: Immunglobulingehalt, Ordinate: Quadrat des Präzipitatdurchmessers. Nach der angegebenen Zeit ist die Diffusion bis zu den durch gestrichelte Linien markierten Flächen fortgeschritten. Nach 130 Std. ist die lineare Proportionalität für alle bestimmbaren Ag-Konzentrationen erreicht (durchgezogene Gerade). Die Punkte (o) zeigen den IgG-Gehalt der vom Plattenhersteller[1] gelieferten Standardlösungen.

Bei höheren als den angegebenen Immunglobulin-Konzentrationen entstanden durch Überlagerung benachbarter Präzipitate unscharfe und entrundete Präzipitatränder.

1) Behringwerke Marburg

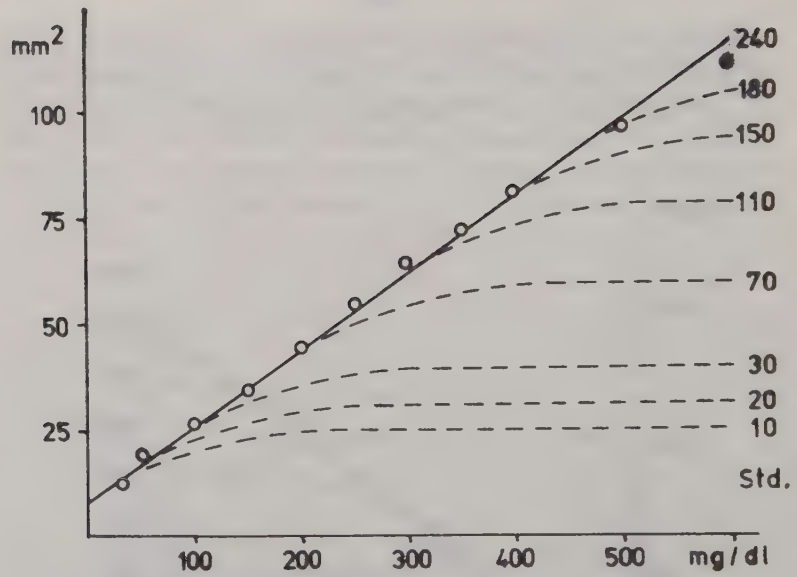

Abb.13: Beziehung zwischen IgM-Konzentration und Präzipitatfläche. Erläuterungen in Abb.12. Lineare Proportionalität bei hohem Ag-Gehalt wird erst nach 240 Std. erreicht.

In Tab.8 sind die Zeiten bis zum Diffusions-Endpunkt für verschiedene Immunglobulin-Konzentrationen angegeben. Es wird deutlich, daß die Diffusionsgeschwindigkeit stark von der Molekülgröße abhängt. Abb.14 zeigt die Beziehung zwischen Präzipitatdurchmesser und Diffusionszeit bei Untersuchung gleichkonzentrierter 7-S-IgG- und 19-S-IgM-Lösungen.

c (mg/dl)	7-S-IgG d (mm)	t (Std.)	19-S-IgM d (mm)	t (Std.)
30	4,5	8	3,8	10
50	5,5	12	4,4	15- 20
100	6,8	24	5,2	25- 40
150	8,2	46	5,9	40- 60
200	9,2	68	6,7	60- 80
250	10,2	90	7,4	80-100
300	11,1	110	8,o	100-120
350	12,1	130	8,5	120-140
400	-	-	9,o	140-160
500	-	-	9,8	160-200
600	-	-	10,5	190-240

Tab.8: Präzipitatdurchmesser d und Diffusionszeit t bei einer Immunglobulinkonzentration c am Diffusionsendpunkt (Temperatur 20 - 22°C).

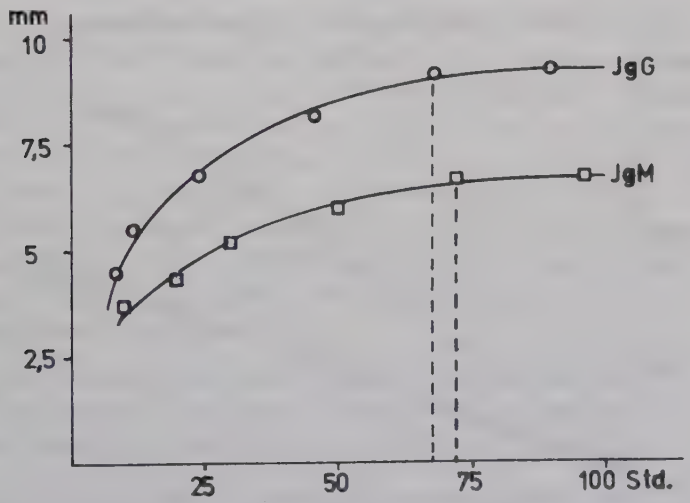

Abb.14: Beziehung zwischen Präzipitatdurchmesser (Ordinate) und Diffusionszeit (Abszisse) für 7-S- und 19-S-Immunglobuline (c = 200 mg/dl, Temperatur 21 ± 1°C). Die Diffusionsendpunkte sind eingezeichnet.

Molekülgröße und Diffusionskoeffizient: 7-S-Moleküle diffundieren wesentlich schneller als 19-S-Globuline (Tab.8) und erreichen bei gleicher Konzentration den Diffusions-Endpunkt zu einem früheren Zeitpunkt und mit einem größeren Präzipitatdurchmesser (Abb.14). Der Unterschied wird verdeutlicht durch die verschiedenen Regressionsgeraden (Abb.15), deren Parameter in Tab.9 zusammengestellt sind.

	IgG	IgM
D	$3,6 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
b	o,39	o,18
a	7,6	8,6
s_b	$2,1 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
$s_{y.x}$	2,09	1,49

Tab.9: Lineare Regression für RID-Immunglobulin-Bestimmungen. Diffusionskoeffizient D nach BACKHAUSZ (1967), Temperatur 21 ± 1°C. Der Unterschied der Regressionskoeffizienten b ist hochsignifikant.

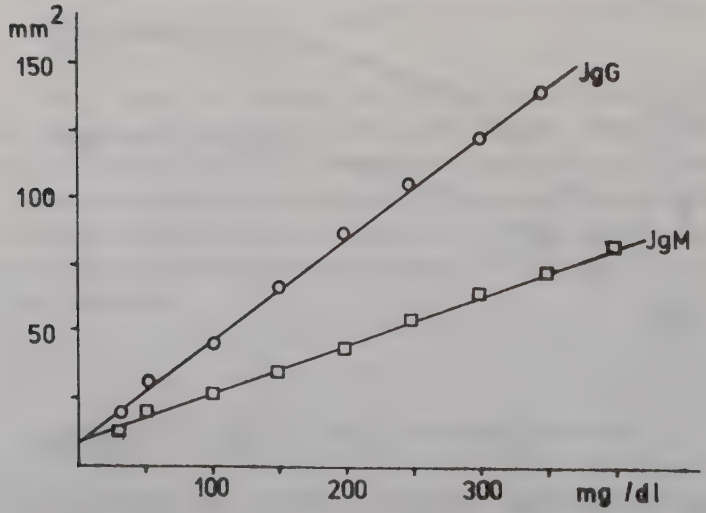

Abb.15: Regressionsgeraden bei RID-Bestimmung von IgG und IgM (Werte in Tab.9). Abszisse: Immunglobulin-Konzentration, Ordinate: Quadrat des Präzipitatdurchmessers.

In Tab.10 sind die für die Beurteilung der Methodenqualität bedeutsamen Parameter angegeben. Bei Untersuchung monoklonaler Immunglobuline zeigte die RID zwar eine gute Reproduzierbarkeit (hohe Genauigkeit), aber einen sehr hohen systematischen Fehler, so daß sich ein hoher Gesamtfehler ergab.

Immunglobulin	F	V	G
IgG-M-Gradient	14,o %	5,6 %	27,1 %
IgM-M-Gradient	41,o %	6,8 %	59,8 %
monoklonale Immunglob.	26,o %	6,2 %	42,o %
polyklon. IgG	o,8 %	4,1 %	9,1 %

Tab.10: RID-Qualität bei Bestimmung mono- und polyklonaler Immunglobuline. Begriffserklärung in "Statistische Methoden" S.13(F= Methodenfehler, V= Variationskoeffizient, G= Gesamtfehler).

Bei einer Untersuchung an 119 identischen Proben eines IgG-M-Gradienten wurde am Diffusionsende ein Variationskoeffizient von 3,o % bestimmt (Auswertung nach $c \sim d^2$; wurden die Durchmesser nicht quadriert und die Berechnung nach $c \sim d$ vorgenommen, so betrug V nur 1,5 %). Mit Hilfe des Chi^2-Anpassungstestes wurde festgestellt, daß die Streuung der Präzipitatflächen um den Mittelwert in Form einer Normalverteilung erfolgt(Tab.11). Daraus ergeben sich statistische Ansätze für die Validierung von RID-Ergebnissen (LORENZ 1975).

Für polyklonale Immunglobuline ist der systematische Fehler minimal, die Reproduzierbarkeit der RID ist dabei besser als bei der Biuret-Methode (Tab.10).

d(mm)	6,9	7,o	7,1	7,2	7,3	7,4	7,5	7,6
n	1	5	12	38	46	14	3	0

Auswertung nach	c ~ d	c ~ d^2
$\bar{x}$	7,25 mm	52,55 mm^2
s	o,11 mm	1,60 mm^2
V	1,51 %	3,04 %
Chi^2-Test	signifikant	nicht signif.
Verteilung	nicht normal	normalverteilt

Tab.11: Gleichzeitige Untersuchung von 119 identischen Proben eines IgG-M-Gradienten mit der RID. Die Durchmesser d wurden n-mal abgelesen. Quadrierung der Durchmesser vermindert die Methodengenauigkeit (V), die Meßwerte sind dabei normalverteilt.

Empfindlichkeit der RID: Im Bereich sehr niedriger Ag-Konzentrationen besteht keine lineare Beziehung zwischen Immunglobulingehalt und Präzipitatfläche. Lag der Präzipitatdurchmesser unter 4 mm, dann ergaben die Berechnungen nach der Regressionsgerade zu hohe Konzentrationswerte. Dies zeigte sich nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor daran, daß die für die Stammlösung errechneten Werte erheblich höher waren als nach Berechnung aus mittel- und hochkonzentrierten Probelösungen. Dieser Fehler wirkte sich bis zu einem Präzipitatdurchmesser von 4,5 mm bei IgG und IgM aus. In Tab.12 sind die Grenzwerte der Nachweisempfindlichkeit zusammengefaßt. Abb.16 zeigt die Annäherung der Regressionsgeraden in einem nichtlinearen Übergang an eine Horizontale im Grenzbereich der Empfindlichkeit.

	IgG	IgM	
Qualitativer Nachweis	4	7	µg/ml
Quantitative Bestimmbarkeit	400	700	µg/ml
	(= 40	70	mg/dl)

Tab.12: Grenzen der RID-Empfindlichkeit beim qualitativen Nachweis mit LC-Immundiffusionsplatten (SUGG und KOCH 1978) und bei quantitativer Immunglobulinbestimmung (verläßliche Werte oberhalb der Grenzkonzentration).

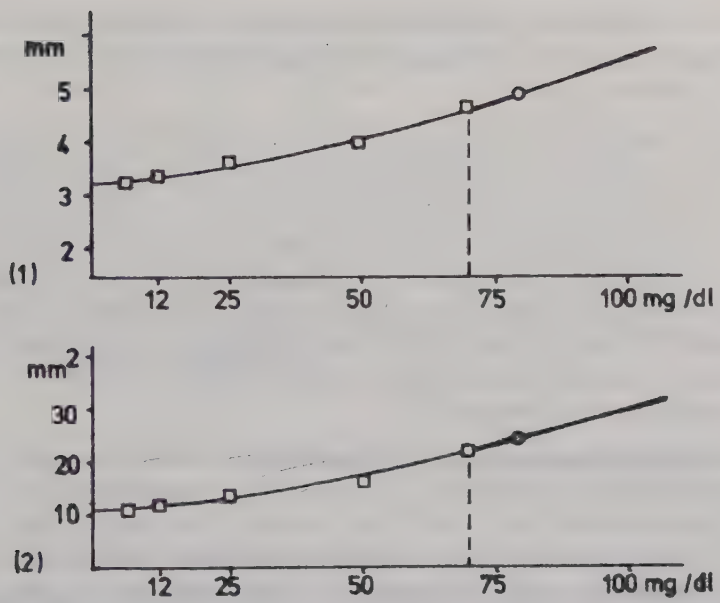

Abb.16: Veränderung der Präzipitatgröße bei niedriger Ag-Konzentration (IgM). Abszisse: Nach KJEHLDAL bestimmte IgM-Konzentration, Ordinate: In (1) Präzipitatdurchmesser, in (2) Quadrat des Durchmessers. Im nichtlinearen Teil der Kurve wird der IgM-Gehalt fälschlich zu hoch bestimmt. Der senkrechte Strich zeigt die Untergrenze der exakten Ag-Bestimmbarkeit, o gibt den Wert der stärkstverdünnten Standardlösung an.

Temperatur: Die Diffusion dauerte bei 4°C 1,5-mal so lange wie bei der üblichen Raumtemperatur von 20 -22°C. Bis 40°C entsprach die Zunahme der Diffusionsgeschwindigkeit der von BACKHAUSZ (1967) angegebenen Regel (Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit pro 10° um 25 %). Bei höheren Temperaturen wanderten die Präzipitatränder überproportional schneller, dabei war die Randschärfe der Niederschläge zunehmend aufgehoben. Als temperaturabhängig erwies sich der Präzipitatdurchmesser am Diffusionsende.

Pro Grad Wärmezunahme vergrößerte er sich um etwa o,1 mm (innerhalb eines Proben-Konzentrations-Bereichs von 100 bis 200 mg/1oo ml).

Bei inkonstanter Temperatur nahm der methodische Fehler beträchtlich zu. Besonders ungünstig wirkte sich Wärme (ca. 30°C) beim Einpipettieren aus, wenn die darauffolgende Diffusion bei niedriger Temperatur (22°) stattfand. Die Präzipitatdurchmesser niedrigkonzentrierter Ag-Lösungen waren dann gegenüber höherkonzentrierten Proben zu groß. Entsprechende Fehler waren nach Einpippetieren bei Raumtemperatur und anschließender Diffusion im Kühlschrank zu beobachten.

Probenzusammensetzung und Ionenstärke: Untersucht wurde der Einfluß verschieden konzentrierter Ionenlösungen (Kationen Na^+, Mg^{++}, Ca^{++} mit Anion Cl^-), der Einfluß des pH und einer hohen Konzentration nicht-antigener Proteine (vor allem Albumin). Als Beeinträchtigung des Diffusionsverhaltens wurde nur eine statistisch signifikante Abweichung gewertet (T-Test war zulässig). Die Ergebnisse sind in Tab.13 dargestellt.

Lösungsmittel	I	pH	Abweichung ist
NaCl o,9 %	o,17	7,2	(=Standardlösg.)
NaCl 20,o %	3,46	7,2	nicht signif.
$MgCl_2$ 2,o %	o,35	6,5	"
$CaCl_2$ 2,o %	o,28	6,5	"
$CaCl_2$ 20,o %	2,68	6,3	signif. vermind.
Tris-HCl-NaCl	o,26	4,o	nicht signif.
Tris-HCl-NaCl	o,26	9,5	"
H_2O (mit NaN_3)	o,o2	7,5	signif. vermind.
Albumin 16g/dl=50mval/l		7,5	nicht signif.
IgM 8 g/dl=10mval/l		6,9	"

Tab.13: RID-Bestimmung des gleichen Antigens aus verschiedenen Lösungen. Ein Zusatz von o,1 % NaN_3 war immer enthalten. Untersucht wurden IgG und IgM als Antigene (in IgM-Lösung nur IgG).

Ein Einfluß hoher Ionenkonzentrationen auf die Diffusion war nicht nachzuweisen. Lediglich durch hohen Ca^{++}-Gehalt der Lösung wurde eine Verkürzung der Diffusionsstrecke erzielt. In ionenarmen Lösungen (Wasser) war diese ebenfalls verkürzt. Hohe Konzentrationen von nicht als Antigen wirksamen Proteinen beeinträchtigten die Diffusion nicht. IgG oder IgM in Lösungen von 16 g/dl Albumin erreichten denselben Präzipitatdurchmesser wie gleichkonzentriertes Immunglobulin in o,9 % NaCl. Auch die H^{+}-Konzentration war in weiten Bereichen ohne Einfluß auf die Diffusion veränderbar.

3. Vergleichsuntersuchungen von Lösungen monoklonaler Immunglobuline

3.1 Seren mit hoher Konzentration eines M-Gradienten

Die mit der RID bestimmten Immunglobulinkonzentrationen wurden im folgenden den EBP-Werten (aus Elektrophorese und Biuret-Protein errechnet) für Beta- oder Gamma-Globuline gegenübergestellt (Tab.14). Die RID-Ergebnisse für IgG und IgM - summiert - konnten in der Regel mit den Gamma-, die RID-IgA-Werte mit den Beta-Globulinen verglichen werden. Bei stark anodisch wanderndem IgA-Paraprotein wurde die Summe der 3 Immunglobulinklassen als Gamma-Globuline betrachtet.

Für Seren mit monoklonalem IgG oder IgM zeigten RID und EBP hochsignifikant unterschiedliche Werte (WILCOXON-Paardifferenzen-Test). Auch bei Unterteilung der Immunglobulinkonzentrationen in 3 Stufen unterschieden sich die Ergebnisse der Methoden in jeder Gruppe hochsignifikant. Mit zunehmender Ag-Konzentration wurden diese Differenzen, wie man am Quotienten RID/EBP sieht, immer deutlicher (Tab.14). Der Quotient zeigt eine besonders große Wertediskrepanz für monoklonales IgM.

	n	RID-Konz.	Mittelwerte RID	EBP	Quot. RID/EBP	Abweichg. d. Meth.
IgG	131	1 -15	4,03	3,19	1,26	hochsign.
	56	1 -2,5	1,77	1,70	1,04	"
	45	2,5-5	3,65	3,01	1,21	"
	30	5 -15	8,88	6,25	1,42	"
IgA	39	1 -7,5	2,75	2,56	1,07	"
	22	1 -2,5	1,47	1,49	o,99	nicht sign.
	11	2,5-5	3,76	3,53	1,06	"
	6	5 -7,5	5,96	4,89	1,22	signif.
IgM	47	1 -20	6,23	3,02	2,06	hochsign.
	15	1 -2,5	2,42	1,67	1,45	"
	11	2,5-5	4,4o	2,54	1,75	"
	21	5 -20	9,97	4,2o	2,37	"

Tab.14: Vergleich von RID- und EBP-Bestimmungen in Seren mit M-Gradienten. Signifikanzprüfung mit WILCOXON-Paardifferenztest. n = Zahl der Wertepaare, Konzentrationen in g/1oo ml. Unterteilung in Konzentrationsstufen nach den RID-Werten (Spalte 2).

Monoklonales IgA erreichte keine so hohe Serumkonzentration wie die anderen Immunglobuline. Eine Abweichung der RID- von den EBP-Werten war deutlich nachzuweisen und wurde in der Untergruppe der hochkonzentrierten Wertepaare signifikant (Tab.14).

Innerhalb der Immunglobulinklassen wurden starke Schwankungen des Verhältnisses RID/EBP beobachtet, und zwar nicht nur zwischen Seren verschiedener Patienten, sondern in Einzelfällen auch bei Serum derselben Patienten im Verlauf vieler Bestimmungen. 15 Wertepaare eines über 4 Jahre kontrollierten IgM-M-Gradienten mit RID-Ergebnissen von 4,7 bis 18,8 und EBP-Werten von 2,o bis 5,5 g/dl ergaben den mittleren Quotienten RID/EBP = 2,5 ; die Einzelquotienten lagen zwischen 1,4 und 3,4. Von der IgM-Konzentration waren die Quotienten nicht abhängig.

Trotz solcher Schwankungen ist das Verhältnis RID/EBP für jede Immunglobulinklasse charakteristisch. Abb.17 stellt die Quotienten in den verschiedenen Konzentrationsstufen graphisch dar.

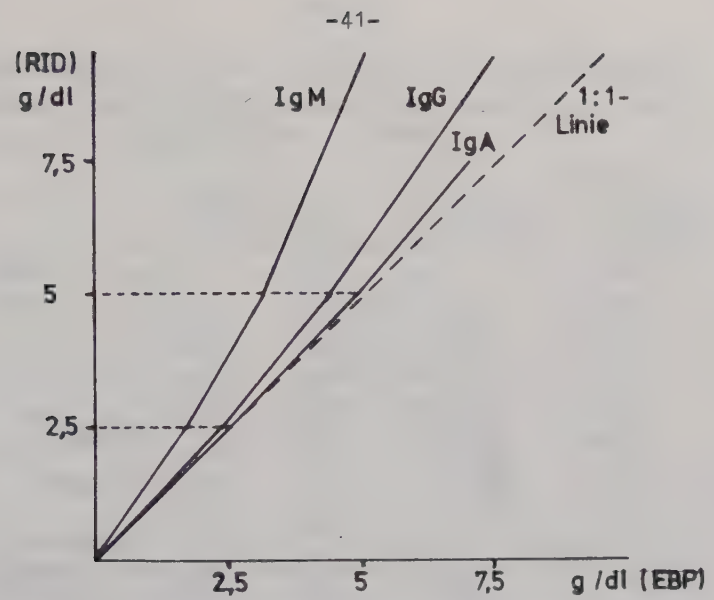

Abb.17: Graphische Darstellung des Verhältnisses RID/EBP in 3 verschiedenen Konzentrationsstufen bei Untersuchung von Seren mit M-Gradienten (Werte von Tab.14).

Auch bei der linearen Regression ergaben sich charakteristische Werte für die 3 Immunglobulinklassen (Tab.15).

	n	b	a	s_b	$s_{y.x}$	r
IgG	131	1,36	-o,31	$4{,}2 \cdot 10^{-3}$	1,32	o,909
IgA	39	1,08	0	$4{,}9 \cdot 10^{-3}$	o,69	o,924
IgM	47	2,46	-1,2	$2{,}4 \cdot 10^{-2}$	1,85	o,912

Tab.15: Ergebnisse der linearen Regression bei Untersuchung von Seren (M-Gradienten der 3 Immunglobulinklassen) mit RID- und EBP-Technik (Werte Tab.14). Begriffserklärung in "Statistische Methoden" S.13.

Abb.18 zeigt die Regressionsgeraden bei Vergleich von RID- und EBP-Ergebnissen für IgG, -M und -A.

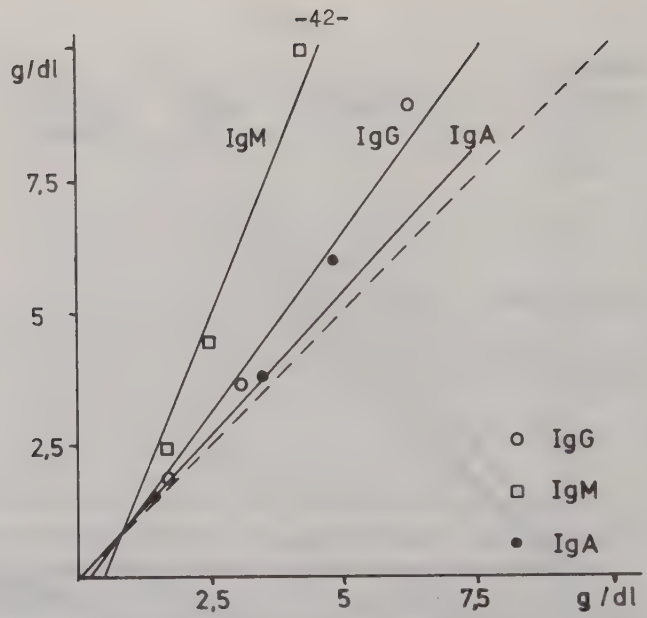

Abb.18: Regressionsgeraden von Wertepaaren der EBP- (Abszisse) und RID-Bestimmungen (Ordinate) bei Untersuchung von IgG, -A oder -M in Seren mit M-Gradienten. Bei Wertegleichheit ist Steigung 1 zu erwarten (gestrichelte Linie). Werte in Tab.15.

Die dargestellten Beziehungen verdeutlichen, daß die EBP-Ergebnisse für Immunglobuline im allgemeinen niedriger liegen als die der RID. Es wurde gezeigt, daß das Ausmaß des Bestimmungsunterschieds sowohl abhängig ist von der Immunglobulinklasse als auch von der Konzentration des M-Gradienten im Serum.

3.2 Mischlösungen monoklonaler Immunglobuline mit Reinalbumin.

Untersucht wurden die unter "Elektrophorese" (S.11) beschriebenen Verdünnungsreihen. Die RID-Immunglobulinwerte wurden mit den EBP-Gamma-Globulinen verglichen. In Tab.16 sind die Bestimmungs-Mittelwerte und die Quotienten RID/EBP zusammengestellt. Die Ergebnisse der linearen

Regression gibt Tab.17 an. Nach dem WILCOXON-Paardifferenztest sind alle Abweichungen der RID- von den EBP-Werten hochsignifikant.

		Mittelwerte RID	EBP	Diff. d. EBP-Konz.	Quotient RID/EBP
IgG	ges.	3,56	2,64	o,46	1,35
Le	1	8,07	6,27	2,1o	1,29
	2	4,07	3,1o	o,5o	1,31
	3	1,48	1,3o	o,35	1,14
Hö	1	7,45	5,84	o,43	1,28
	2	3,95	2,8o	o,15	1,41
	3	1,61	o,94	o,15	1,71
Ra	1	4,7o	3,42	o,54	1,37
	2	2,4o	1,5o	o,o1	1,58
	3	1,24	o,7o	o,o8	1,77
	4	o,63	o,47	o,25	1,31
IgM	ges.	4,98	2,05	o,63	2,43
Vö	1	9,4o	3,8o	1,8o	2,47
	2	4,81	1,42	o,77	3,38
	3	2,54	o,59	o,16	3,25
	4	1,28	o,26	o,o4	4,92
Li	1	11,81	5,7o	1,04	2,07
	2	5,81	2,85	o,68	2,04
	3	2,78	1,27	o,23	2,19
	4	1,4o	o,51	o,31	2,75

Tab.16: Ergebnisse der Immunglobulinbestimmung mit RID und EBP in verschiedenen Verdünnungsstufen von Albumin-Globulin-Mischlösungen. Jede Immunglobulin-Konzentration wurde bei 4 verschiedenen Albumin-Konzentrationen untersucht, wodurch bei der EBP beträchtliche Differenzen zwischen niedrigstem und höchstem Gamma-Globulinwert entstanden (Spalte 3). Der Albumingehalt betrug 8/4/2/1 oder 10/5/2,5/1,25 g/1oo ml. Alle Angaben in g/1oo ml.

Die Mittelwerte von RID und EBP-Bestimmungen unterschieden sich um das 1,35-fache für IgG bzw. 2,43-fache für IgM (Tab.16). Die Regressionskoeffizienten beim Methodenvergleich betrugen 1,25 bzw. 1,95 (Tab.17).

	n	b	a	s_b	$s_{y.x}$	Mittelwerte RID	EBP
IgG	30	1,25	o,29	o,o86	o,46	3,56	2,64
Le	9	1,24	o,o9	o,165	o,94	4,54	3,58
Hö	9	1,19	o,56	o,o4	o,21	4,34	3,19
Ra	12	1,32	o,23	o,o54	o,23	2,25	1,53
IgM	28	1,95	o,97	o,23	1,09	4,98	2,05
Vö	12	1,92	1,6o	o,36	1,54	4,5o	1,52
Li	16	1,98	o,35	o,1o	o,63	5,45	2,58

Tab.17: Ergebnisse der linearen Regression von RID- und EBP-Immunglobulinwerten bei Untersuchung von Albumin-Globulin-Mischlösungen. Begriffserklärung in "Statistische Methoden" S.13. Mittelwerte in g/dl.

Die Abweichung der Regressionskoeffizienten vom Wert 1, der bei Methodengleichheit zu erwarten wäre, ist in einem Fall signifikant, sonst hochsignifikant.

An der Differenz der EBP-Konzentrationen (Tab.16) wurde die Albumin-Abhängigkeit des elektrophoretischen Gamma-Globulinwertes deutlich: Dieser änderte sich bei gleichbleibendem Immunglobulingehalt mit wechselnder Albuminkonzentration (waagrechte Striche in Abb.19). So betrug im Versuch IgG-Le der EBP-Mittelwert der höchsten Konzentrationsstufe 6,27 g/dl (Tab.16,Spalte 2); er schwankte um $\pm$ 1,05 g/dl (Spalte 3 gibt als Differenz 2,1 g/dl an). Den höchsten Gamma-Globulinwert von 7,32 g/dl erbrachte die EBP bei niedrigem Albumingehalt von 1 g/dl, den niedrigsten Wert von nur 5,22 g/dl bei hohem Albuminanteil (8 g/dl); bei 2 und 4 g Albumin/dl lagen die Gammaglobuline dazwischen. Die Tendenz dieser Beobachtung, nämlich die zunehmende Benachteiligung des Gamma-Globulins in der EBP bei steigender Albuminkonzentration, wurde in sämtlichen Untersuchungsreihen bestätigt.

Wurde die Albuminkonzentration konstant gehalten und der Immunglobulingehalt der Lösung verändert, so war bei Abnahme der Globulinkonzentration der EBP-Gamma-Globulinwert über die Relation hinaus zunehmend zu klein gegenüber dem Albuminanteil. Der überproportionale Abfall der Gamma-

Globulinwerte wird sichtbar am Quoteinten RID/EBP, der von Verdünnungsstufe 1 bis Stufe 3 oder 4 fast regelmäßig zunimmt, besonders eindrucksvoll bei den Untersuchungen mit IgM (Tab.16). Der Unterschied der Bestimmungsergebnisse mit RID- und EBP-Technik fällt also bei niedrigen Immunglobulinkonzentrationen mehr ins Gewicht. In Abb.19 ist das Verhältnis der Ergebnisse mit beiden Methoden graphisch dargestellt. Das Schaubild scheint im Widerspruch zu den in Abb.17 wiedergegebenen Relationen in Seren zu stehen, wo große Differenzen zwischen den Bestimmungsarten bei hohem Globulingehalt auftraten.

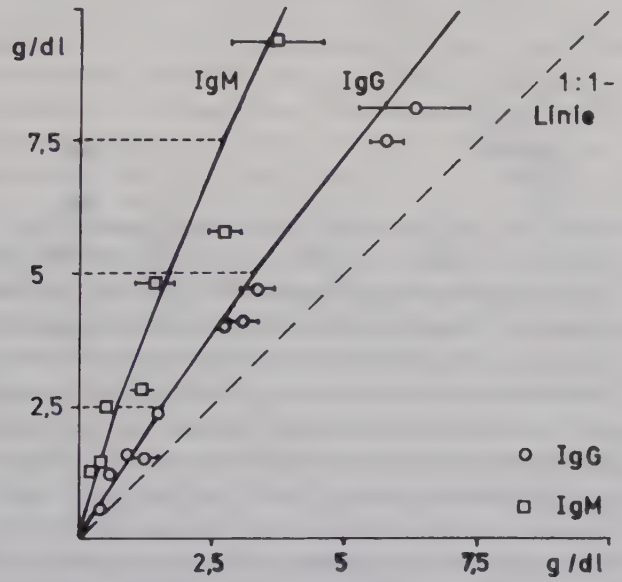

Abb.19: Verhältnis von RID- zu EBP-Ergebnissen bei Untersuchung von Albumin-Globulin-Mischlösungen. Abszisse: EBP-, Ordinate: RID-Konzentrationswerte. Die vom Albumingehalt abhängigen EBP-Wert-Schwankungen sind als horizontale Striche eingetragen. Im Mittel liegen die Wertepaare auf den für jede Konzentrationsstufe berechneten Geraden (größere Methoden-Abweichung bei niedrigen Immunglobulin-werten ist zu erkennen).

Abb.20 zeigt die Regressionsgeraden beim Methodenvergleich.

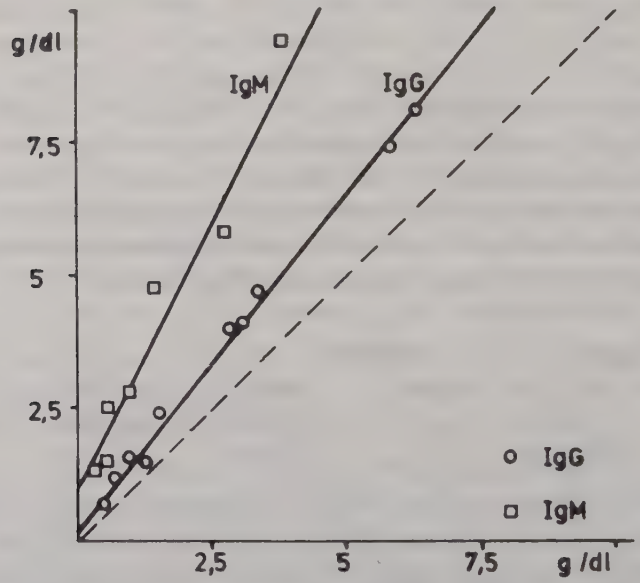

Abb.20: Regressionsgeraden für IgG- und IgM-Wertepaare bei Untersuchung von Albumin-Immunglobulin-Mischlösungen mit EBP- (Abszisse) und RID-Technik (Ordinate). Die Steigungen für IgG- und IgM-Gerade sind hochsignifikant verschieden. Bei Wertegleichheit von RID und EBP wäre Steigung 1 zu erwarten (unterbrochene Linie). Werte in Tab.17.

3.3 Reinlösungen monoklonaler Immunglobuline

Die bereits im Kapitel 2.3 verglichenen Methoden der KJEHLDAL- und Biuret-Eiweißbestimmung werden im folgenden der RID-Untersuchung von Immunglobulinen gegenübergestellt. In Tab.18 sind die mit den 3 Techniken bestimmten und auf die Stammlösung umgerechneten Mittelwerte der Immunglobulinkonzentrationen verschiedener IgG- und IgM-Lösungen angegeben.

	KJEHLDAL	Biuret	RID	Quotient KJEHLDAL/RID
IgG-Le	14,27	14,33	15,9o	1,11
——	13,44	13,92	14,72	1,09 > 1,11
	12,3o	12,67	13,97	1,14
Ra	8,83	8,46	10,16	1,15
	13,14	13,85	16,18	1,23 > 1,19
Hö	14,2o	14,66	15,77	1,11
IgM-Vö	14,54	14,46	21,17	1,46
——	11,48	11,95	14,45	1,26 > 1,36
Li	14,25	14,64	22,9o	1,61
	10,21	10,25	13,37	1,31 > 1,46
Al	13,01	13,05	18,44	1,42

Tab.18: Vergleich von KJEHLDAL-, Biuret- und RID-Ergebnissen bei Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen einer Stammlösung aus 8 Verdünnungsstufen. Die Berechnung der Quotienten RID/EBP ergab für IgG einen mittleren Wert von 1,14 ; für IgM 1,41 (Werte in mg/dl)

In allen Fällen liegen die RID-Werte über den Ergebnissen der anderen Methoden, doch ist das Ausmaß unterschiedlich, wie der Quotient RID/EBP zeigt : Für IgG liegen die Bestimmungs-Mittelwerte der RID um das 1,14-fache über denen der KJEHLDAL-Untersuchung, für IgM um das 1,41-fache. Dieses Verhältnis schwankt bei verschiedenen M-Gradienten einer Immunglobulinklasse erheblich und ändert sich auch bei den einzelnen Bestimmungsansätzen (Tab.18). Der Unterschied zwischen den Methoden sowie zwischen den RID/EBP- Quotienten für IgG und IgM ist signifikant. Für die Abweichungen ist die RID-Methodik verantwortlich zu machen, da die KJEHLDAL-Untersuchung alle Immunglobulinklassen qualitativ gleich erfaßt. Die Biuret-Ergebnisse stimmen mit den KJEHLDAL-Werten weitgehend überein (Tab. 18). Tab.19 und Abb.21 zeigen die Parameter der linearen Regression für KJEHLDAL- und RID-Wertepaare. Die Regressionskoeffizienten sind 1,17 für IgG- und 1,33 für IgM-Bestimmungen.

	b	a	s_b	$s_{y.x}$	Abweichg. von 1 ist
IgG-Le	1,24	-12	o,15	3,93	signif.
	1,18	-4,o	o,17	4,57	"
	1,14	-o,8	o,11	3,22	"
Ra	1,13	-3,4	o,21	5,39	nicht sign.
	1,31	-8,6	o,24	7,11	signif.
Hö	1,12	1,6	o,14	4,43	nicht sign.
IgM-Vö	1,50	-4,9	o,24	8,33	hochsign.
	1,14	o,5	o,25	7,54	nicht sign.
Li	1,51	11,7	o,o6	1,83	hochsign.
	1,18	-5,2	o,15	4,18	signif.
Al	1,32	-9,2	o,26	8,25	"

Tab.19: Ergebnisse der linearen Regression für RID- und KJEHLDAL-Wertepaare. Mittlerer Regressionskoeffizient der IgG-Bestimmungen: 1,18 ; der IgM-Bestimmungen: 1,33. Die Anzahl der Wertepaare pro Untersuchungsreihe war jeweils 8 (Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen). Begriffserklärung in "Statistische Methoden" S.13.

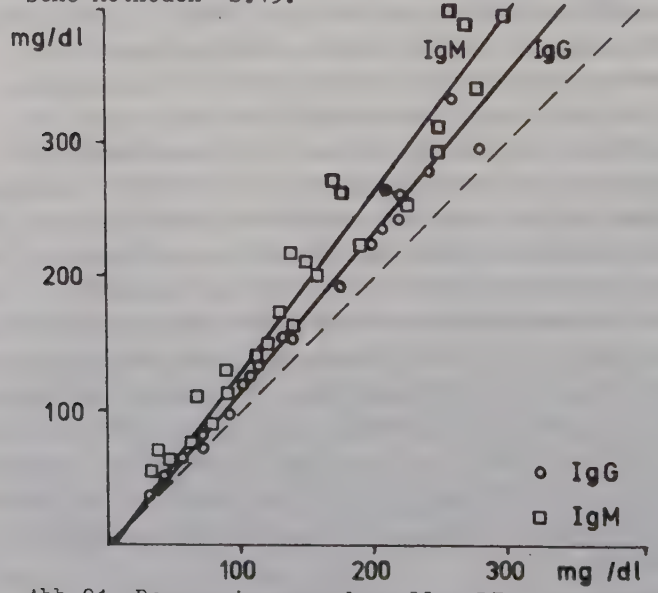

Abb.21: Regressionsgeraden aller RID- und KJEHLDAL-Wertepaare bei IgG- und IgM-Untersuchung. Abszisse: KJEHLDAL-, Ordinate: RID-Werte von Tab.19.

4. Vergleichsuntersuchungen von Lösungen polyklonaler Immunglobuline

4,1 Seren mit erhöhtem Gehalt von polyklonalem IgG

Die Gegenüberstellung der EBP-Gamma-Globulinwerte und der RID-(IgG+IgM)Ergebnisse zeigt zwar mit zunehmender IgG-Konzentration größer werdende Differenzen, doch sind die Abweichungen in keiner Konzentrationsstufe signifikant (WILCOXON-Paardifferenz-Test). Insgesamt weichen die Ergebnisse der Methoden allerdings signifikant voneinander ab (Tab.20).

n	RID-Konz.	Mittelwerte RID	EBP	Quot. RID/EBP	Abweichg. d. Meth.
35	2 - 7	3,43	3,21	1,07	signif.
17	2 - 3	2,7o	2,6o	1,03	nicht sign.
15	3 - 5	3,65	3,42	1,07	"
3	5 - 7	6,53	5,53	1,18	"

Tab.20: RID- und EBP-Ergebnisse in Seren mit über 2 g/1oo ml erhöhter Konzentration von polyklonalem IgG. Signifikanzprüfung mit dem WILCOXON-Paardifferenztest. n = Zahl der Wertepaare, Konzentrationen in g/1oo ml. Unterteilung in Konzentrationsstufen nach den RID-Werten.

Bei der linearen Regression wird eine erhebliche Streuung der Werte deutlich (Korrelationskoeffizient o,75). Das Verhältnis von RID zu EBP ist von Serum zu Serum unterschiedlich. Bei niedrigen IgG-Konzentrationen liegen relativ höhere EBP- als RID-Werte vor, wie der niedere Regressionskoeffizient zeigt (b = o,8 ; Abb.22), der durch einen hohen y-Achsenabstand bei x = 0 zustandekommt.

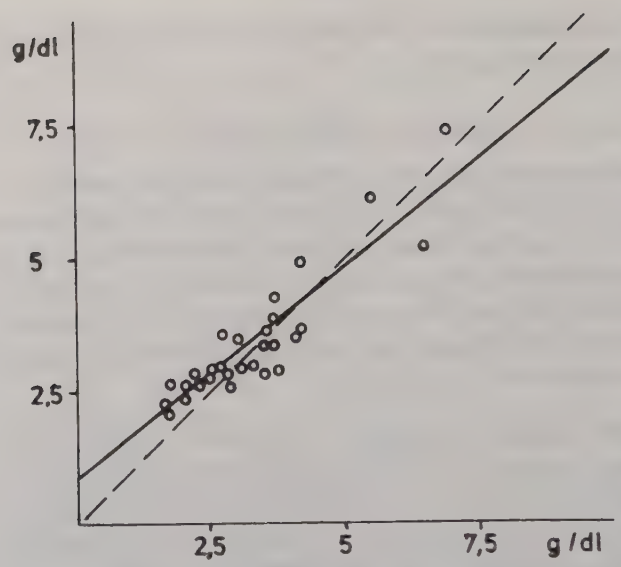

Abb.22: Regressionsgerade von EBP- (Abszisse) und RID- (Ordinate) Wertepaaren bei Untersuchung von Seren mit erhöhter Konzentration an polyklonalem IgG. b = o,8o ; a = o,89 ; $s_b = 2{,}3 \cdot 10^{-3}$; $s_{y.x} = o{,}78$. Bei Wertegleichheit ist b = 1 zu erwarten (unterbrochene Linie).

4.2 Mischlösungen polyklonalen Immunglobulins mit Reinalbumin

Die Untersuchung entspricht Kap.3.2. IgG wurde aus 10 gepoolten Normalseren isoliert. In Tab.21 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Wie bei der Untersuchung von M-Gradienten nahm auch hier der elektrophoretische Gamma-Globulin-Gehalt bei gleichbleibender IgG-Konzentration mit zunehmendem Albuminanteil ab. Die Differenz erreichte bis o,93 g/dl. Außerdem war ein Anstieg des Quotienten RID/EBP bei Reduktion der IgG-Konzentration zu verzeichnen. Die absolute Differenz der Ergebnisse wurde erwartungsgemäß mit Konzentrationsabnahme kleiner.

	Mittelwerte RID	EBP	Differenz der EBP-Konzentr.	Quotient RID/EBP
1	6,88	6,03	o,91	1,13
2	3,45	2,91	o,93	1,17
3	1,73	1,42	o,28	1,2o
4	o,9o	o,72	o,23	1,26
	3,oo	2,55		

b	a	s_b	$s_{y.x}$
1,11	o,17	o,o4	o,27

Tab.21: RID- und EBP-Bestimmung von Normal-IgG in Albumin-IgG-Mischlösungen. Der Albumingehalt jeder Konzentrationsstufe betrug zwischen 10 und 1,25 g/dl. Der Mittelwert der Quotienten RID/EBP ist 1,19. Weitere Erklärungen in Tab.16 und in "Statistische Methoden" S.13 ; Angaben in g/dl.

Die Abweichung des Regressionskoeffizienten (b = 1,11) vom Erwartungswert ist signifikant.

4.3 Reinlösungen von polyklonalem Immunglobulin

Die mit der RID in 10 Verdünnungsstufen bestimmte IgG-Konzentration einer Stammlösung stimmte mit den Werten von KJEHLDAL- und Biuret-Untersuchungen gut überein (Tab.22).

Mittelwerte KJEHLDAL	Biuret	RID	Quotient RID/EBP
13,95	14,3o	14,06	o,98
n = 8	10	10	

b	a	s_b	$s_{y.x}$
o,98	1,5	o,o7	2,03

Tab.22: Vergleich von KJEHLDAL-, Biuret- und RID-Ergebnissen bei Untersuchung von reinem polyklonalem IgG. Werte in g/dl. Es wurden n Verdünnungsstufen geprüft. Außerdem sind die Ergebnisse der linearen Regression von KJEHLDAL- und RID-Werten angegeben.

Die Parameter der linearen Regression zeigen, daß eine hohe Übereinstimmung der RID- und KJEHLDAL-Wertepaare in den einzelnen Verdünnungsstufen besteht. Der Quotient RID/EBP und der Regressionskoeffizient b sind wertegleich und kommen dem Erwartungswert 1 sehr nahe, die Abweichung ist nicht signifikant.

DISKUSSION

Der Vergleich von Lyophilisat-Einwaagen und Ergebnissen der Eiweißbestimmung bei Rein-Immunglobulinen ergab stets einen erhöhten Wert - im Mittel um 5,3 % - der Lyophilisatmengen gegenüber dem Proteingehalt (Tab.5). Hergestellt wurde das Lyophilisat nach Dialysieren der Immunglobulinlösungen im Wechselbad oder in der Ultrafiltrationskammer, wobei der Lösungsmittelaustausch auf mindestens 99 % berechnet war. Das zu hohe Lyophilisatgewicht könnte auf schwerlösliche, durch Dialyse nicht entfernbare Verunreinigungen der Lösungen zurückzuführen sein, was wegen der euglobulinbedingten Opaleszenz der Lösungen kaum zu beurteilen ist. Niederschläge nach Auflösung der Lyophilisate, etwa durch Phosphate (JAUREGUI-ADELL 1971), wurden nicht beobachtet. Denkbar ist auch ein zu hoher Ionengehalt des demineralisierten Wassers (Leitfähigkeitsmessungen waren nicht möglich).

Auch VEYS und WIEME (1973) fanden um 20 % höhere Werte des lyophilisierten Eiweißstaubs gegenüber dem tatsächlichen Proteingehalt. Nach ihrer Meinung entstand diese Differenz durch Wasseraufnahme. Durch Wägung unmittelbar im Anschluß an den Lyophilisiervorgang konnte in der vorliegenden Untersuchung ein hydratbedingter Gewichtsüberschuß des Lyophilisats ausgeschlossen werden. Jedenfalls war die Lyophilisat-Einwaage für Zwecke des Methodenvergleichs nicht brauchbar.

Als gute Vergleichsmethode für die Eiweißuntersuchung erwies sich die Trockengewichtsbestimmung nach ROBINSON und HOYDEN (1941), mit der die KJEHLDAL-Methode standardisiert werden kann. Leider stand nicht genügend Immunglobulin-Reinsubstanz zur Verfügung, um für die einzelnen Immunglobulinklassen Umrechnungsfaktoren vom Stickstoff- auf den Eiweißgehalt in der KJEHLDAL-Unter-

suchung zu bestimmen. Solche Faktoren sind in der Literatur nicht zu finden. Da die Immunglobulinklassen unterschiedliche Kohlenhydratanteile haben (HEIDE und HAUPT 1964), ist anzunehmen, daß auch ihre Umrechnungsfaktoren variieren. Die in der Literatur angegebenen Faktoren beziehen sich auf die ammonsulfatgefällten Gamma-Globuline (BRAND et al.1944, BRAND 1946, ARMSTRONG et al.1947) oder in neueren Arbeiten (SUNDERMAN et al.1958) auf die elektrophoretisch abgetrennten Gamma-Globuline (Tab.23).

Autoren	Jahr	gefundener N-Gehalt (%)	Umrechnungsfaktor
BRAND et al.	1944	16,o	6,25
BRAND	1946	15,4	
ARMSTRONG et al.	1947	16,1	
SUNDERMAN et al.	1958	15,4	6,54

Tab.23: In der Literatur angegebene Umrechnungsfaktoren für Gamma-Globuline vom Stickstoff- zum Eiweißgehalt.

Den Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurde der üblicherweise verwendete Faktor 6,25 zugrundegelegt. Spätere Auswertungen mit dem Faktor 6,54 ergaben etwas geringere Differenzen zwischen KJEHLDAL-Werten und Ergebnissen anderer Methoden. So war die Abweichung von Trockengewichts- zu KJEHLDAL-Bestimmung + 2,2 % statt - 2,7 %. Es ist zu erwägen, in Ermangelung neuerer Untersuchungen den Faktor 6,54 zu bevorzugen.

Durch die Schwankung des KJEHLDAL-Wertes um den des Trockengewichts in Abhängigkeit vom benutzten Umrechnungsfaktor wird die Bedeutung dieser Abweichung relativiert. Der systematische Fehler läßt sich nicht auf die Methode zurückführen. Diese ist zwar technisch aufwendig, dafür aber sind Richtigkeit und Genauigkeit hoch (Tab.5). Auf Doppelbestimmungen könnte verzichtet werden (SACHS 1974).

Die Biuret-Eiweiß-Bestimmung nach WEICHSELBAUM (1946) erwies sich ebenfalls als genaue Methode (Tab.4), die zudem einfach durchführbar ist. Die Abweichung von den KJEHLDAL-Werten (+2,o %) bei Untersuchung von Immunglobulin-Reinlösungen ist zwar signifikant, doch liegt dies an der hohen Genauigkeit der Methoden und spricht nicht gegen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse im Methodenvergleich. Die niedrigeren KJEHLDAL-Werte lassen sich teilweise auf einen zu niedrigen Umrechnungsfaktor von Stickstoff- auf Eiweiß-Gehalt zurückführen. Eine Übereinstimmung der mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse wurde bei Serum-Untersuchung festgestellt, eine solche wurde 1950 von FRANK und KOECHER beschrieben. Im Liquor cerebrospinalis dagegen fanden EGGSTEIN und KREUTZ (1955) einen signifikanten Unterschied der Ergebnisse. Unterschiede sind auch beschrieben für bilirubinreiche Seren, in denen sich die Extinktionskurven von Biuret-Komplex und Bilirubin überlagern (KINGSLEY und TERZIAN 1949, FRANK und KOECHER 1950), sowie für glucosereiche Lösungen, in denen die Extinktion durch Cu_2O-Bildung verfälscht wird (HINDSBERG und GLEISS 1950).

Da der Biuret-Komplex sich aus Aminogruppen der hydrolysierten Peptide bildet, ist ein Unterschied der Anfärbung verschiedener Eiweißarten nicht zu erwarten (HOPPE-SEYLER und THIERFELDER 1953) und wurde in der vorliegenden Untersuchung auch nicht beobachtet. Die hohe Genauigkeit der Biuret-Methode war nur gegeben, wenn die Protein-Konzentration der Lösungen nicht über 10 bis 12 g/1oo ml hinausging. WEICHSELBAUM (1946) gibt als Grenze 14 g/dl an. Bei höherem Eiweißgehalt ist die Linearität der Extinktionszunahme $\Delta E/\Delta c$ nicht mehr gewährleistet, wodurch die Proteinkonzentration zu niedrig bestimmt wird. Der Fehler war umso größer, je kürzer die Reaktionspartner vor der Extinktionsmessung aufeinander einwirkten. 2O bis 24 Stunden nach

Mischung der Reaktanten (Grenze der Haltbarkeitsdauer des Biuret-Komplexes) war auch in Lösungen mit sehr hohem Eiweißgehalt die Extinktion der Konzentration proportional. In der Praxis ist aber eine derart lange Wartezeit vor der Messung schlecht durchführbar. Deshalb muß für Routine-Bestimmungswerte über 10 g/dl eine Wiederholung der Untersuchung empfohlen werden in einem 1 : 1 mit o,9 % NaCl verdünnten Lösungsansatz. Seren mit M-Gradienten sind oft hochkonzentriert. Deshalb könnten die bis zu 15 % zu niedrig gefundenen Biuret-Werte bei hohem M-Gradienten-Gehalt an der Entstehung der Differenzen zwischen EBP- und RID-Ergebnissen mitbeteiligt sein.

Den zweifellos größeren Anteil am EBP-Fehler hat die Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie. In der vorliegenden Untersuchung lag bei gleichem Gehalt von Immunglobulin und Albumin in der Lösung der elektrophoretisch bestimmte Gamma-Globulinwert weit unter dem des Albumins (Tab.7), zudem änderte er sich mit der Eiweißkonzentration (Abb.11). Je mehr Albumin im Verhältnis zu Immunglobulin eine Lösung enthielt, desto größer wurde der Fehler des zu niedrig bestimmten Gamma-Globulins und des Albumin-Globulin-Quotienten (Tab.6, Abb.10). Im Mittel gab die Elektrophorese 80 % der "wahren" IgG- und 68 % der "wahren" IgM-Konzentration an. In einzelnen Fällen wurden nur 45 % des tatsächlichen IgM-Gehalts gemessen. Übrigens wurden auch in Normal-IgG-Lösungen die Gamma-Globuline gegenüber den RID-Werten, die für polyklonales IgG standardisiert sind, hochsignifikant zu niedrig erfaßt (WILCOXON-Paardifferenz-Test). Ein einzelnes Elektrophorese-Ergebnis ist nur schwer beurteilbar, da die Einzelwerte erheblich schwanken können : Der Gesamt-Variationskoeffizient betrug 16,3 %. Für IgM-Bestimmungen lag er mit 24,4 % nahe der Grenze zur Unbrauchbarkeit der Methode,die nach

SACHS (1974) bei V > 33 % besteht.

Hauptursache des Elektrophoresefehlers ist die unterschiedlich starke Anfärbung verschiedener Proteine. Mit Amidoschwarz verbinden sich freie Aminogruppen, so daß jedes Eiweiß einen eigenen Färbekoeffizienten hat (HEINZEL et al.1965). Oberhalb einer Proteinkonzentration von 2 g/dl ist nach den Ergebnissen dieser Autoren die Extinktionszunahme nicht mehr linear proportional zur Konzentrationszunahme.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der variierenden Bandenbreite verschiedener Proteine in der Elektrophorese. Die Gamma-Globuline bilden im allgemeinen eine besonders breite Bande. Das Prinzip der Bandentrennung am Tiefpunkt zwischen zwei Peaks muß zu Berechnungsfehlern führen (Abb.23).

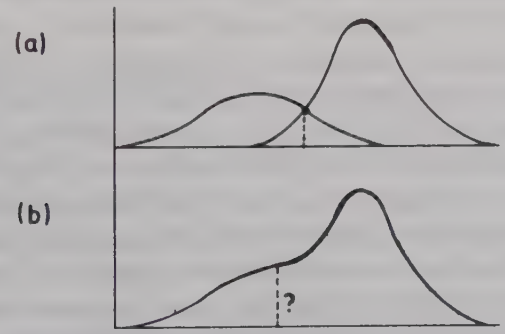

Abb.23: Schema der Überlagerung von Proteinpeaks : a) einzelne Peaks getrennt, b) Extinktions-Summenkurve. Die bei der Auswertung übliche Trennung der Banden am Tiefpunkt in b) führt zu erheblicher Benachteiligung des breiten flachen Peaks.

Beide Fehlerursachen führen zu einer Benachteiligung der Immunglobulinfraktion : Im Normalserum wird die Breite der flachen Gamma-Globulin-Peaks zu wenig berücksichtigt. Bei M-Gradienten wirkt sich die hohe Immunglobulindichte

hemmend auf die Farbstoffsättigung aus, so daß die Extinktion des Peaks relativ zu niedrig ist. Zudem nimmt Albumin, wie die Untersuchungen zeigen, mehr Farbstoff auf als gleiche Globulinmengen. Unter Berücksichtigung aller Fehlermöglichkeiten erscheint es möglich, daß einzelne EBP-Werte nur 40 bis 50 % des "wahren" Immunglobulingehalts wiedergeben.

Die Zonenelektrophorese und damit die EBP-Technik ist für einen quantitativen Vergleich von Ergebnissen der Proteinbestimmung mit verschiedenen Methoden nicht geeignet. Sie ist brauchbar als Routine-Suchtest zur Erfassung grober Veränderungen der Serumeiweiß-Zusammensetzung. Die dabei bestimmten Proteinanteile stimmen mit dem tatsächlichen Serumgehalt dieser Eiweiße nicht überein, so daß EBP-Ergebnisse nur miteinander, nicht aber mit Werten anderer Methoden verglichen werden können.

Eingehend untersucht wurde die einfache radiale Immundiffusion (RID) nach MANCINI et al.(1965). Die von verschiedenen Autoren beschriebene linear-proportionale Beziehung zwischen der Präzipitatfläche - bzw. dem Quadrat des Durchmessers - und der Eiweißkonzentration (VAERMAN et al.1969 a, ALADJEM 1971, BERNE 1974) wurde für einen weiten Konzentrationsbereich bestätigt. Die notwendige Bedingung, das Ende der Diffusion ganz abzuwarten, wird freilich in der Praxis kaum eingehalten, so daß Methodenfehler unnötig groß werden. Die Hersteller käuflicher Immundiffusionsplatten mit Endpunktablesung[1)] pflegen die Diffusionszeit zu kurz anzugeben. So soll IgG bis zu einer Konzentration von 200 mg/dl innerhalb von 50 Std. ausdiffundiert sein; in unseren Untersuchungen betrug der erforderliche Zeitraum bei 22°C etwa 68 Std.(Tab.8). Eine IgM-Lösung bis zu 300 mg/dl brauchte statt der angegebenen 80 Std. etwa 5 Tage bis zum Erreichen des Diffusionsendes.

---

1) hier: Behringwerke Marburg

Bei zu früher Ablesung ist die Regressionskurve nicht linear, sondern geht in höheren Konzentrationsbereichen in eine Asymptote zur Horizontalen über (Abb.12 und 13). Die berechnete Regressionsgerade weist dann eine zu flache Steigung und zu hohen y-Achsenabstand auf. Auch McCRACKEN et al.(1969), CROWLE (1973) und BERNE (1974) stellen die Forderung nach längerer Diffusionszeit. HEREMANS (1971) betont, die Beziehung $c \sim d^2$ sei nur nach Diffusionsende gültig.

Die Auswertung nach FAHEY und McKELVEY (1965), die während der Diffusion erfolgt, wobei der Logarithmus der Konzentration dem Präzipitatdurchmesser proportional ist, ergibt eine wesentlich geringere Methodengenauigkeit (STIEHM 1967, GRANT 1971, BERNE 1974). RÄSÄNEN (1974) fand dagegen diese Berechnungsart als die genaueste, ohne das Problem des Ablesezeitpunkts zu erörtern. Die Auswertung nach $c \sim d^2$ führt nach diesem Autor zu besseren Resultaten als nach $c \sim d$. Die Endpunktablesung soll bei Tri-Partigen^R-Platten[1)] genauer sein als bei Immundiffusionsplatten anderer Hersteller (HOSTY et al.1973).

IgG und IgM zeigen in der RID sehr unterschiedliches Verhalten (Abb.15). 7-S-Moleküle werden im Gelnetz der 1 %igen Agarose fast nicht, 19-S-Moleküle dagegen stark aufgehalten (WIEME 1959), wodurch die Präzipitatgrenzen langsamer wandern und weniger weit diffundieren. Die verschiedenen Diffusionskoeffizienten (BACKHAUSZ 1967) und die hochsignifikant voneinander abweichenden Regressionskoeffizienten (Tab.9) verdeutlichen die Unterschiede.

7-S-Globuline wandern im Gel wiederum langsamer als kleinere Moleküle, wie die Untersuchung von Leichtketten in Anti-Kappa- oder Anti-Lambda-Seren enthaltendem Gel zeigt. Die Wandergeschwindigkeit hängt ab von der Zahl der Ag-Ab-Komplexe mit hohem Molekulargewicht im Verhältnis zur Anzahl freier Antigene im Gel. Dieses Ver-

hältnis wird bestimmt von der Antikörper-Spezifität für das betreffende Antigen. Die Spezifität der Ag-Ab-Reaktion ist bei Immunglobulinen aus M-Gradienten wesentlich geringer als bei polyklonalen Immunglobulinen, gegen die ja das Antiserum gebildet ist. Daher verwundert es nicht, daß Ag-Ab-Präzipitate aus M-Gradienten den Diffusionsendpunkt bei gleichem End-Präzipitatdurchmesser um Stunden früher erreichten als Niederschläge aus Normal- oder Standard-Immunglobulinlösungen. Die Lösungs-Konzentration der untersuchten monoklonalen Immunglobuline war dabei niedriger als die der polyklonalen. Die monoklonalen Globuline hatten weniger Determinanten für das Antiserum, bildeten daher weniger hochmolekulare Ag-Ab-Komplexe, die ihre Diffusion behinderten, und wanderten somit schneller im Gel als normale Immunglobuline.

In diesem Zusammenhang sei die Bedeutung der Präzipitat-Randschärfe für die Genauigkeit der Auswertung hervorgehoben. Bei IgG stellten sich 2 bis 8 Stunden nach Probenauftrag - je nach Ag-Konzentration - sichtbare Präzipitate ein. Erst nach 3 bis 4 Tagen hatten alle Niederschläge, auch die mit großen Durchmessern, die endgültige Randschärfe erreicht. Die Ränder von Präzipitaten über 11 mm Durchmesser lösten sich nach 5 bis 6 Tagen allmählich wieder auf und wurden undeutlich. Offensichtlich entstand durch nachwandernde Antigene, die vielleicht zeitweise durch Komplexbildung stationär gewesen waren oder langsamer diffundiert waren, ein Antigen-Überschuß. Scharfe Ränder bildeten sich dann nicht mehr aus. Präzipitate mit Durchmessern über 12 mm entwickelten sich von vornherein nur als verwaschener, kantiger Fleck, wobei Interferenzen benachbarter Proben durch Überwandern von Antigen die Entrundung bewirkten.

IgM-Niederschläge waren zum Zeitpunkt der Ablesung für logarithmische Auswertung (6 - 12 Std.) ungefärbt kaum sichtbar. Nach 48 und 72 Stunden waren die Präzipitate

schwach, erst nach 4 bis 5 Tagen zeigten sich deutliche, scharfe Ränder, deren Intensität bis etwa zum 10. Tag weiter zunahm (Ausfällung nachwandernden Antigens bei vernachlässigbar geringer Vergrößerung des Präzipitatdurchmessers). Je größer ein Präzipitat war, desto später wurden Geltrübung und Randbildung deutlich. Nach 10 bis 14 Tagen lösten sich die Ränder großer Niederschläge (Durchmesser über 9 mm) allmählich auf.

Die von MULDER et al.(1972 a) sowie MULDER und VERHAAR (1973) beschriebenen Doppelringe von Präzipitaten, die für Seren mit M-Gradienten typisch sein und durch Mangel an spezifischen Antikörpern gegen Fd-Fragmente zustande kommen sollen, wurden in unserer Untersuchung nur im Fall eines einzigen IgG-M-Gradienten beobachtet (Die Niederschläge waren nicht gefärbt). Für IgM beschreiben MULDER et al.(1972 b) Doppelringe bei Vorhandensein von 19-S- und 7-S-Molekülen, also bei unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten. BOKHOUT (1975 a) sieht die Ursache für die Entstehung mehrerer Ringe um ein Auftragloch - am gefärbten Präparat sollen sie auch bei polyklonalem Antigen sichtbar werden - in der unterschiedlichen Präzipitation der verschiedenen Immunglobulin-Unterklassen durch die Antiseren, deren Eigenschaften bezüglich dieser Unterklassen stark variieren. Zur besseren Beurteilung empfiehlt BOKHOUT (1975 b) die Präzipitat-Anfärbung; eine quantitative Auswertung der inneren Ringe lehnt er ab.

Bei niedrigem Antigengehalt erwies sich die lineare Beziehung $c \sim d^2$ als ungültig, wenn der Präzipitatdurchmesser weniger als 1 mm über den Durchmesser des Auftragloches hinausging. Von entsprechenden Beobachtungen berichten GRABNER et al.(1972). Theoretisch müßten die Niederschläge im Ab-Überschuß bereits unmittelbar um das Loch ausfallen. Nach Abb.16 trifft dies nicht zu : Ein sichtbares Präzipitat entsteht erst in deutlichem Abstand von der Auftragstelle. Bei steigender Ag-Konzentration nimmt zunächst nicht der Durch-

messer, sondern die Intensität des Niederschlags zu. Wahrscheinlich findet in der Umgebung des Auftragloches nach dem Einpipettieren der Probe ein schneller Lösungseinstrom statt. Die Antigene "überrennen" den um das Loch gelegenen Antikörpergürtel (BACKHAUSZ 1967) bzw. die peripherwärts gerichtete Strömung reißt Antikörper und eingeschwemmtes Antigen mit (CROWLE 1973). BECKER (1969) fand die Wirkung des Mitreißens der im Gel enthaltenen Immunglobuline bei Antiserum-Titerbestimmungen so ausgeprägt, daß er die Proportionalität der Konzentration mit dem Quadrat des Durchmessers ganz in Frage stellte. Wie zu erwarten, nimmt der Einschwemmungseffekt mit steigendem Probevolumen zu (BECKER 1969). Erst nach Sistieren des Flüssigkeitseinstroms kommt es zur Bildung von Ag-Ab-Komplexen und im Ab-Überschuß fallen Präzipitate aus. Der Mindestabstand vom Auftragloch bis zum Ort sichtbarer Niederschläge betrug o,2 bis o,3 mm. Der minimale Präzipitatdurchmesser war demnach 3 - 3,5 mm (Lochdurchmesser 2,5 - 3 mm). Präzipitate mit Durchmesser unter 4 bis 4,5 mm waren für die Auswertung unbrauchbar (Abb.16), da zu hohe Globulinkonzentrationen errechnet wurden. Im Bereich der linearen Proportionalität, also auf der Regressionsgeraden liegen Konzentrationswerte über 40 mg/dl (IgG) bzw. 70 mg/dl (IgM), was einem Niederschlags-Durchmesser von 4,7 mm entspricht (Tab.12). Die absolute Empfindlichkeitsgrenze der RID bei qualitativem Immunglobulinnachweis besteht bei hundertfach niedrigerem Globulingehalt (Tab.12). MANCINI et al.(1965) geben dafür 1,25 µg/ml, REIMER et al.(1970) 2 µg/ml an. Die Werte der vorliegenden Untersuchung sind wohl höher, weil sie an monoklonalem Immunglobulin gewonnen wurden.

Die Temperatur während der Diffusion sollte konstant sein ($\pm$ 1°C) und der Probenauftrag bei der gleichen Temperatur erfolgen wie der Diffusionsvorgang. Durch Wärmeschwankungen von mehr als 5°C entstehen Zwischenpräzipitate (LUEKER und CROWLE 1963, MANCINI et al.1965, CROWLE

1973). Bei höherer Einfüll- als Diffusionstemperatur wird die Anfangsdiffusion beschleunigt, so daß alle Präzipitat-Durchmesser um den gleichen Betrag zu groß werden. Dies hat zur Folge, daß bei der Auswertung Lösungen mit niedriger Ag-Konzentration relativ zu hohe Bestimmungswerte erreichen. Ein geeigneter Temperaturbereich für die RID liegt zwischen 20 und 25°C. Bei Kälte wird die Diffusionszeit unnötig verlängert (bei 4°C um das 1,5-fache). Die Forderung von FAHEY und McKELVEY (1965) nach Diffusion bei 4°C muß demnach nicht unterstützt werden. Bei Wärme über 25°C werden die Präzipitatränder zunehmend größer, da der Diffusionskoeffizient pro 10° um 25 % zunimmt (BACKHAUSZ 1967). Die Ränder werden unschärfer und dadurch die Bestimmungsfehler größer. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur Feststellung HEREMANS' (1971), daß die Temperatur keinen Einfluß auf das Diffusionsende habe. MANCINI et al.(1965) empfehlen eine Diffusion bei 37°C, wogegen abgesehen vom methodischen Fehler der große technische Aufwand spricht (Arbeiten im Brutschrank). GRABNER et al.(1972) untersuchten die Diffusion bei 4, 24, 37 und 50°C und beschreiben lediglich zunehmende Diffusionsgeschwindigkeit. Bei Temperaturen über 45°C beginnt nach unseren Beobachtungen der thermische Zerfall der Antikörper : Die Diffusion erfolgt überproportional schnell, die erzielten Präzipitate sind unscharf begrenzt und viel zu groß (Eine kurzzeitige Erwärmung des Antiserums beim Plattengießen auf 50°C hat freilich kaum Auswirkungen).

Bei hohen Genauigkeitsanforderungen dürfen die Immundiffusionsplatten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden. Durch die allmähliche Zersetzung valenter Antikörper im Gel zeigen sich ähnliche Effekte wie bei zu hohen Diffusionstemperaturen.

Die Untersuchung der Bestandteile der Antigenlösung zeigte, daß keine hemmende Wirkung hoher Elektrolyt-

konzentrationen der Probe auf den Diffusionsverlauf eintrat (Tab.13). Lediglich ein hoher Ca^{++}-Gehalt verkürzte die Diffusionsstrecken signifikant. Calcium scheint die Präzipitatbildung aus löslichen Ag-Ab-Komplexen zu fördern. Demineralisiertes Wasser führte wegen seiner sehr geringen Ionenstärke ebenfalls zu signifikant kürzeren Diffusionswegen. Dabei spielt die Euglobulinentstehung und Ag-Ausfällung vor Eintritt der Probelösung ins Gel eine entscheidende Rolle, so daß für die Reaktion mit dem Antikörper weniger Antigen zur Verfügung steht. Die von HEREMANS (1971) empfohlene Übereinstimmung der Salzkonzentration von Probe und Gel ist nicht erforderlich.

Weder eine pH-Erniedrigung bis 4,o noch eine Erhöhung bis pH 9,5 hatte einen nachweisbaren Einfluß auf die Präzipitatbildung. Hohe Eiweißkonzentrationen der Probelösung hatten ebenfalls keine Veränderung des Diffusionsablaufs zur Folge : Nicht einmal der hohe kolloidosmotische Druck einer 16-g-%igen Albuminlösung störte die Immunglobuline beim Eindringen oder der Ausbreitung im Gel. Auch KALFF (1970) fand bei IgG und IgM keinen Einfluß von Fremdeiweiß auf das RID-Ergebnis, jedoch beschrieb er einen solchen bei IgA. Insgesamt wurden Diffusion und Ag-Ab-Reaktion durch Ionenkonzentration und Ioneneigenschaften nicht bzw. nur im Falle des Ca^{++} beeinflußt. Die Serumzusammensetzung kann also, auch wenn sie pathologisch ist, die RID in keiner Weise beeinträchtigen.

Für die Methodengenauigkeit entscheidend ist die Konstanz des Probevolumens, das bei den verwendeten Platten 5 µl betrug. Der Pipettierfehler dürfte den größten Anteil am Variationskoeffizienten ausmachen. GRABNER et al.(1972) unterstreichen die Bedeutung des Pipettierfehlers für die Methodengenauigkeit. HOSTY et al.(1973) betonen zusätzlich, daß auch die Gelhöhe exakt konstant sein müsse. Da der Diffusionskoeffizient sich mit der Gelhöhe ändert,

haben schon kleine Unebenheiten beträchtliche Ungenauigkeit zur Folge (HILL 1968). Neben diesen Faktoren hebt CROWLE (1973) auch die Bedeutung einer homogenen Gelkonzentrierung hervor.

Das Loch zum Probenauftragen sollte gleichmäßig rund sein und das Gel beim Ausstanzen nicht gezerrt werden, damit nicht ovale Präzipitate entstehen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden Meßwerte dann eliminiert, wenn die im rechten Winkel zueinander bestimmten Durchmesser um mehr als o,1 mm differierten. Das Ablesen der Präzipitatdurchmesser sollte wegen der beträchtlichen Unterschiede der Beurteilung stets vom selben Untersucher vorgenommen werden.

Wichtig ist die gleichmäßige Verteilung des Antiserums im Gel. Verschiedene Antiserumchargen dürfen sich in ihren Eigenschaften nicht unterscheiden. In einigen der genannten Punkte sind käufliche den selbsthergestellten Immundiffusionsplatten überlegen, doch weisen HOSTY et al.(1973) auf die großen Differenzen zwischen Meßwerten auf Platten verschiedener Hersteller hin. Ursache dafür ist nach Ansicht dieser Autoren meist die unterschiedliche Antiserumqualität. Von Bedeutung für die Methodengenauigkeit ist auch die horizontale Lagerung der Platten schon während des Probenauftragens sowie das Feuchthalten der Diffusionskammer. Dagegen war in unserer Untersuchung der bei der Verdünnung der Probelösungen entstehende Fehler fast zu vernachlässigen und auch in stark verdünnten Lösungen kaum festzustellen. Die Genauigkeit war gleich groß, wenn die einzelnen Verdünnungsstufen direkt aus der Stammlösung hergestellt wurden wie wenn sie über eine Verdünnungsreihe entstanden waren.

Unter Einhaltung der genannten Bedingungen fanden wir eine hohe Methodenqualität der RID (Tab.10). Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Auswertung nach

Diffusionsende. Die Variationskoeffizienten (V = 6,2 % für RID-Bestimmung von monoklonalem, 4,1 % bei polyklonalem IgG) enthalten die Fehler, die durch Verwendung verschiedener Antiserum-Chargen und Untersuchung zu verschiedenen Zeiten zustandekamen. Nach McCRACKEN et al. (1969) weichen die RID-Ergebnisse bei Bestimmung an verschiedenen Tagen signifikant voneinander ab. Von SCHUMACHER und KESSLER (1968) werden höhere V-Werte angegeben (für IgG 7,3 - 8,2 %). MASSEYEFF und ZISSWILLER (1969), GRABNER et al.(1972) sowie BURKE und McLAUGHLIN (1976) legen V-Werte für RID-Untersuchung polyklonaler Immunglobuline vor, die mit unseren Ergebnissen gut übereinstimmen. Bei gleichzeitiger Bestimmung von 119 identischen Proben eines IgG-Paraproteins fanden wir ein V von 3 % (Tab.11). MANCINI et al.(1965) errechneten dafür 2 %, KALFF (1970) 1,1 - 3,5 % pro Platte, GRABNER et al.(1972) 3,o bis 5,2 %. McBEAN et al.(1974) geben 2,4 % für die RID-Bestimmung von Alpha-2-Makroglobulin an.

In der vorliegenden Untersuchung wird eingewogenes Immunglobulin mit immunologisch bestimmtem (in Gewichtseinheiten pro Volumen beschriebenem) verglichen. Gegen diesen Ansatz könnten Bedenken angeführt werden, immunologisch bestimmte Immunglobuline auf Gewichtsbasis zu standardisieren. ROWE et al.(1972) sowie REIMER und MADDISON (1976) betonen die Vorzüge der Immunglobulin-Messung in Internationalen Einheiten pro Volumen. Dagegen bestimmten HUMPHREY und BATTY (1974) exakte Relationen zwischen Einheiten und Gewicht für die internationalen Referenzpräparate von IgG, -A und -M. Da in der vorliegenden Arbeit für alle Tests sowohl Immundiffusionsplatten als auch Standardseren desselben Herstellers verwendet wurden - das Verhältnis von Einheiten zu Gewicht darf somit als konstant gelten - ist der obige Einwand nicht relevant.

Bei Untersuchung von polyklonalem IgG, auf das die Standardlösungen geeicht sind, traten gegenüber der KJEHLDAL-Bestimmung praktisch keine Abweichungen auf. Der Regressionskoeffizient (b = o,98) kommt dem von GRABNER et al.(1972) angegebenen Wert (> o,99) nahe, der jedoch beim Vergleich mit immunologisch bestimmten Standardseren gewonnen wurde. Reproduzierbarkeit und Gesamtfehler der RID waren besser als bei der Biuret-Methode und kamen fast der KJEHLDAL-Bestimmung gleich, so daß für Routineuntersuchungen auf die üblichen Doppelbestimmungen verzichtet werden könnte (SACHS 1974).

Anders waren die Verhältnisse bei den rein dargestellten monoklonalen Immunglobulinen. Zwar blieb, wie die Variationskoeffizienten (Tab.10) zeigen, die Reproduzierbarkeit der RID-Ergebnisse recht gut, doch nahm der systematische Fehler derart zu, daß die Werte teilweise unbrauchbar waren. Bei einem Gesamtfehler von 27 % ist die Bestimmung monoklonalen IgG's noch vertretbar - Doppelbestimmungen erhöhen die Richtigkeit nicht -, dagegen dürfte die RID zur Konzentrationsbestimmung von IgM-M-Gradienten bei einem G von 60 % gar nicht verwendet werden (SACHS 1974). Deshalb wird neuerdings die Reduktion des IgM auf 7-S-Moleküle vorgeschlagen (DE BRUYN und KLEIN 1976).

Die Größe des Fehlers war für die einzelnen M-Gradienten verschieden und für eine Serumprobe jeweils charakteristisch. Bei Untersuchung von Seren derselben Patienten, in größeren Zeitabständen vorgenommen, variierten die Werte stärker als bei zeitlich zusammenliegenden Bestimmungen. Die RID ergab gleiche oder höhere, nie aber niedrigere Werte als die KJEHLDAL-Untersuchung der Rein-Immunglobuline. Die Relation RID/KJEHLDAL blieb von ganz niedrigen bis zu sehr hohen Verdünnungen gleich; es gibt keinen Hinweis, daß große RID-Präzipitate besonders

falsche Ergebnisse erbringen (sofern die Durchmesser im beschriebenen Rahmen liegen).

Als Fehler-Ursache wird die geringe Spezifität der Antigene gegenüber dem Antiserum angenommen (JENSEN et al.1969, RAJEWSKY et al.1969, LIETZE et al.1970, MULDER et al.1972 a, BOKHOUT 1975 a und b, REIMER und MADDISON 1976). Das im Plattengel enthaltene Antiserum ist polyvalent, d.h. gegen polyklonale Immunglobuline unterschiedlicher Determinanten gerichtet und mit Normal-Immunglobulin standardisiert. Besteht die Probe aus monoklonalem, immunologisch identischem Immunglobulin, dann ist nur ein Teil der Antikörper in der Lage, eine Bindung mit dem Antigen einzugehen. Ist die Ag-Konzentration des M-Gradienten hoch, so steht im Gel nicht genügend Antikörper zur Verfügung : Es wird nur ein schwaches Präzipitat mit ständig progredientem Rand ausgebildet, dieser wird mit zunehmender Niederschlagsgröße immer unschärfer, das Antigen wandert weiter bis zum Gelrand oder in benachbarte Präzipitate. Diesen Diffusionsverlauf beschreiben ALADJEM et al.(1968) bei Ag-Überschuß ; in unseren Untersuchungen war er bei M-Gradienten zu beobachten, deren Konzentration weit unter der für die RID-Bestimmung polyklonaler Immunglobuline zulässigen Höchstgrenze lag.

Auch bei niedriger Konzentration von monoklonalem Immunglobulin sind für die Ag-Ab-Reaktion pro Flächeneinheit weniger Antikörper vorhanden als für polyklonales Immunglobulin. Demnach diffundieren die Antigene bzw. die im Antigen-Überschuß gebildeten löslichen Ag-Ab-Komplexe weiter als normal, ehe das zur Präzipitatbildung nötige Ag-Ab-Gleichgewicht erreicht ist. Das monoklonale Immunglobulin schafft also in der RID einen relativen Antigen-Überschuß.

Die Verlängerung der Diffusionsstrecke hängt ab von den Determinanten-Eigenschaften des jeweiligen M-Gradienten. Sind Determinanten normaler Immunglobuline wenig re-

präsentiert, so können schon bei niedrigem Lösungsgehalt des M-Gradienten sehr große Präzipitate entstehen und die daraus berechneten Konzentrationswerte weit überhöht sein. Ist das monoklonale Immunglobulin auch im Normalserum in hoher Konzentration vorhanden oder hat es hohe Affinität zu polyklonalen Immunglobulinen, dann liegt durch die größere Validität des Antiserums das Bestimmungsergebnis dem "wahren" Globulingehalt näher. Einige untersuchte M-Gradienten stimmten in der RID mit gleichkonzentriertem polyklonalen Immunglobulin vollkommen überein.

Unterschiedliche Präzipitatdurchmesser bei gleicher Konzentration können auch mit polyklonalen Immunglobulinen auftreten, wenn das Verhältnis der Immunglobulin-Unterklassen in der Ag-Lösung schwankt und die Spezifität der Antiseren gegen einzelne Unterklassen verschieden ist. So fanden BOKHOUT (1975 a) bis zu 100 %, REIMER und MADDISON (1976) bis zu 50 % voneinander abweichende RID-Ergebnisse für IgG. Eine Verbesserung der Bestimmungs-Genauigkeit wird zwar mit der Präparation von Referenz-Immunglobulinen durch ROWE et al.(1972) ermöglicht, doch ist damit noch kein Antiserum geschaffen, das gleichmäßig geringe Unterklassen-Spezifität besitzt. Als Abhilfe schlägt BOKHOUT (1975 b) spezifische Unterklassen-Antikörper vor, deren RID-Ergebnisse z.B. zu einem Gesamt-IgG-Wert zu addieren seien. Für M-Gradienten ist dieses Vorgehen zu grob : Theoretisch müßte für jedes Paraprotein ein eigenes Antiserum gebildet oder aber das normale Anti-Immunglobulin-Serum neu standardisiert werden (FAHEY und McKELVEY 1965).

Jedenfalls läßt die Standardisierung polyvalenter Antiseren mit Normal-Immunglobulinen offen, ob nach Wechsel einer Antiserum-Charge die gleiche oder ähnliche Spezifität gegenüber einzelnen M-Gradienten

besteht. REIMER et al.(1970) sprechen davon, daß verschiedene Antiseren - somit auch neue Antiserum-Präparationen - die spezifischen Antigene (z.B. IgM-Lambda oder -Kappa) unterschiedlich "sehen". Ändern sich die Serumkonzentrationen in der Verlaufskontrolle bei einem Patienten sprunghaft, dann sollte zunächst der Einfluß eines solchen Antiserum-Wechsels ausgeschlossen werden. In unseren Untersuchungen waren die Konzentrations-Unterschiede bei M-Gradienten nach Chargenwechsel jedoch nie signifikant.

Der Ansicht von VEYS und WIEME (1973), daß Myelom-Immunglobuline als Referenz-Antigene zur Standardisierung der RID nicht in Betracht kommen, ist unbedingt zuzustimmen. Ebensowenig sollte eine bestimmte Unterklasse im Referenz-Serum überwiegen (BOKHOUT 1975 a). Die Herstellung eines speziellen Anti-Myelom-Immunglobulin-Serums ist nicht praktikabel, da für jedes monoklonale Immunglobulin eine besondere Immunisierung erforderlich wäre, um Antikörper gegen die jeweiligen Antigen-Determinanten zu erhalten. Zudem bestünde keine Möglichkeit exakter Standardisierung.

Für monoklonales IgM ist die Überhöhung der RID-Werte im Vergleich zu den KJEHLDAL-Ergebnissen wesentlich ausgeprägter als für IgG-Paraproteine. Dies könnte durch die ungünstigen Diffusionseigenschaften des Makroglobulins bedingt sein. JAMES et al.(1966) stellten einen anderen Diffusionsablauf bei großen Antigenmolekülen (Alpha-2-Makroglobulin) fest, so daß die Konzentrationsberechnung nach $c \sim d^2$ zu Fehlern führt. Auch MASSEYEFF und ZISSWILLER (1969) sahen einen Vorteil in der Proportionalität $c \sim d$. SCHMID (1969 b) konnte - im Gegensatz zu uns - ein deutliches Diffusionsende der RID bei Makromolekülen nicht erkennen. RICHTER (1972) fand ebenfalls einen Einfluß des Molekulargewichts auf das RID-Ergebnis, was er am Beispiel verschiedener Dextran-Fraktionen untersuchte. McBEAN et al.(1974)

schlagen aus diesem Grund ein anderes Gelmedium (Cellulose-Acetat) für die RID-Bestimmung von Makromolekülen vor, auf dessen Vorteile schon VERGANI et al. (1967) sowie NERENBERG (1972) hinwiesen. BACKHAUSZ (1967) gibt für 19-S-IgM einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten an als für 7-S-IgG (Tab.9). Fehler bei der M-Gradienten-Bestimmung können jedoch nicht durch unterschiedliche Diffusionseigenschaften erklärt werden, wenn Standard-IgM und M-Gradient 19-S-Moleküle sind. Der längere Diffusionsweg der M-Gradienten-Antigene bis zur Präzipitatbildung ist vor allem durch geringe Spezifität gegenüber dem Antiserum bedingt. Die Verlängerung der Diffusionsstrecke wirkt sich bei 19-S-Paraprotein auf das Bestimmungsergebnis stärker aus als bei 7-S-Globulin, da der Regressionskoeffizient für 19-S-Moleküle in der RID wesentlich kleiner ist (Tab.9). Somit wird verständlich, warum der Fehler bei der RID-Untersuchung von monoklonalem 19-S-IgM im Vergleich zu 7-S-IgG relativ größer ist.

KLEIN et al.(1973) fanden 2 bis 3 IgM-Paraprotein-Untergruppen, die in der RID verschiedene Regressionskoeffizienten haben sollen. Individuelles IgM-Paraprotein gehöre nur einer dieser Fraktionen an. Deshalb könnten RID-Ergebnisse verschiedener IgM-M-Gradienten nicht quantitativ verglichen werden. Durch Reduktionsbehandlung mit Dithioerythritol (DTE) lassen sich alle IgM-Untergruppen auf 7-S-Moleküle zurückführen, die Unterschiede verschwinden. DE BRUYN und KLEIN (1976) fanden nach Reduktion wesentlich exaktere Bestimmungswerte der RID auch für M-Gradienten. JOHANSSEN (1975) empfiehlt ebenfalls dieses Vorgehen.

Während wir rein dargestellte M-Komponenten neben der RID in erster Linie mit der KJEHLDAL-Methode untersuchten, diente bei der Immunglobulinbestimmung in Seren und Albumin-Globulin-Mischlösungen die EBP-Technik zum Vergleich mit der RID. Sofern die Bedingungen für die Biuret-

Eiweißbestimmung eingehalten werden, entstehen EBP-Fehler nur durch die Ungenauigkeit der Zonenelektrophorese, deren Ergebnisqualität ja abhängt von Lösungskonzentration und -zusammensetzung. In unterschiedlichem Ausmaß ist der EBP-Fehler bei allen Immunglobulinen vorhanden und kann, da er in der Methode begründet liegt, durch sorgfältige Technik nicht beseitigt werden.

Für die Bestimmung von polyklonalen Immunglobulinen ist die RID eine so exakte Methode, daß sie der EBP in jeder Hinsicht überlegen ist. Dies wurde für IgG gezeigt (Kap. 4.3). IgM ist mit der EBP im allgemeinen ohnehin nicht erfaßbar.

Der Vergleich von RID- und EBP-Ergebnissen aus Seren mit M-Gradienten deckt auf, daß die Werte in keiner Immunglobulinklasse übereinstimmen. Die statistisch geringsten Unterschiede sind bei Seren mit monoklonalem IgA festzustellen (RID 7 % höher; Tab.14). Dabei werden wegen der elektrophoretischen Wandereigenschaft des M-Gradienten den RID-Ergebnissen meist Beta-Globulin-Werte gegenübergestellt. Diese enthalten u.a. Transferrin und erfassen somit außer IgA noch andere quantitativ bedeutende Proteine. Deshalb kann aus der geringen Abweichung nicht geschlossen werden, daß die Methoden tatsächlich zu übereinstimmenden Resultaten führen, zumal nur wenige Vergleichswerte vorliegen und die höchste IgA-Konzentration nur 7,5 g/dl beträgt. Demgegenüber erreicht der höchste IgG-Wert 15 g/dl, IgM sogar 22 g/dl. Diskrepanzen zwischen RID und EBP können für IgA also statistisch weniger gesichert werden. Insgesamt scheint die RID-Bestimmung für monoklonales IgA hinreichend genau zu sein; den EBP-Werten ist sie aus den genannten Gründen vorzuziehen. Gut geeignet zur quantitativen IgA-Erfassung ist auch die Rocket-Immunelektrophorese (LAURELL 1972, WEEKE 1973).

Bei der Untersuchung von monoklonalem Serum-IgG fanden JENSEN et al.(1969) um 40 % höhere RID- als EBP-Werte. Sie errechneten einen Regressionskoeffizienten der beiden Methoden von 1,38. Wir bestimmten die Serumkonzentrationen der M-Gradienten in der RID um 26 % höher als in der EBP (Tab.14), der Regressionskoeffizient lag bei 1,36 (Tab.15). In IgG-Albumin-Mischlösungen waren die RID-Werte sogar 42 % höher als die EBP-Ergebnisse (Tab.16). Dagegen lagen die RID-Werte monoklonaler IgG-Reinlösungen nur 14 % über den entsprechenden KJEHLDAL-Resultaten (Tab.18). Die größere Abweichung bei Untersuchung von Seren und Mischlösungen ist auf den Elektrophoresefehler und zum Teil auf den Fehler bei der Biuret-Bestimmung, also auf die EBP-Technik zurüchzuführen. Die RID-Werte waren im Mittel "nur" um 14 % zu hoch.

In Seren mit monoklonalem IgM waren die RID-Ergebnisse durchschnittlich doppelt so hoch wie die EBP-Resultate (Tab.14). In IgM-Albumin-Mischlösungen übertraf die RID die EBP-Bestimmung sogar um das dreifache (Tab.16). Bei dieser Untersuchung zeigt sich der EBP-Fehler in vollem Ausmaß, da nicht wie in Seren andere Proteine miterfaßt werden. Bei rein dargestelltem monoklonalem IgM betrug die Abweichung der RID- von den KJEHLDAL-Werten im Mittel 41 %, in Einzelfällen bis zu 51 % (Tab.18). Der Vorschlag der IgM-Reduktion mit Dithioerythritol (DE BRUYN und KLEIN 1976) wurde bei der Untersuchung nicht berücksichtigt.

Ausgehend von diesen Meßwerten der RID-Fehlbestimmung wurden Faktoren zur Korrektur der RID für die Konzentrationsberechnung monoklonaler Immunglobuline bestimmt. Der RID-Fehler erwies sich nicht als konzentrationsabhängig, vielmehr war in Immunglobulin-Reinlösungen die Relation RID/KJEHLDAL für alle Verdünnungsstufen gleich. Deshalb kann für jede Immun-

globulinklasse nur ein konzentrations-unabhängiger Korrekturfaktor angegeben werden. Dieser Faktor berücksichtigt lediglich die Differenz zwischen RID- und KJEHLDAL-Werten bei Untersuchung von Immunglobulin-Reinlösungen. Der EBP-Fehler, welcher ja konzentrationsabhängig ist, wird nicht korrigiert, so daß die EBP-Resultate durchschnittlich immer noch erheblich niedriger ausfallen als die korrigierten RID-Ergebnisse.

Mit dem Korrekturfaktor wird der RID-Wert multipliziert (Tab.24). Unterhalb der angeführten Grenzkonzentration sollten die RID-Ergebnisse nicht korrigiert werden, da dann eine Überlagerung des M-Gradienten mit dem von der RID richtig bestimmten Normal-Immunglobulin nicht ausgeschlossen ist. Bei monoklonalem IgG entspricht dieser Vorschlag der Beobachtung, daß die Differenz zwischen RID- und EBP-Wert für Serumkonzentrationen unter 2,5 g/dl gering ist (Tab.14) und kaum klinische Bedeutung hat. Auf die Korrektur des RID-Ergebnisses sollte auch verzichtet werden, wenn die resultierende Serumkonzentration niedriger wäre als der EBP-Wert.

Immunglob.	Quotient RID/KJEHLDAL	Korrektur-faktor	Untere Grenzkonz.
IgG	1,14	o,878	2,5 g/dl
IgA	1,04	1	keine Korr.
IgM	1,41	o,705	1,o g/dl

Tab.24: Korrekturfaktoren für das RID-Ergebnis bei Untersuchung monoklonaler Immunglobuline. Unterhalb der Grenzkonzentration sollte der RID-Wert nicht korrigiert werden.

Korrigierte RID-Ergebnisse sollten besonders gekennzeichnet sein (z.B. IgG_f = 2840 mg/dl), wobei das f für "Faktor" stehen soll. In Tab.25 sind Beispiele für die Anwendung der Korrekturfaktoren aufgeführt.

RID-IgG-Wert	IgG_f	RID-IgM-Wert	IgM_f
2800	2460	1200	850
2200	nicht korr.	960	nicht korr.
7600	6670	8400	5920

Tab.25: Anwendungsbeispiele für die Korrektur von RID-Werten bei Bestimmung monoklonaler Immunglobuline (Konzentrationen in mg/dl).

Die vorgeschlagenen Korrekturfaktoren gelten nur für RID-Bestimmungen, die mit derselben Technik, den gleichen Antiseren und identischem Auswerteverfahren durchgeführt wurden wie in der vorliegenden Arbeit (Tri-Partigen^R-Immundiffusionsplatten[1)], Endpunktablesung und Berechnung nach $c \sim d^2$). Die Faktoren können natürlich nur den mittleren Fehler ausgleichen, der sich bei RID-Untersuchung vieler monoklonaler Immunglobuline zeigte. Für die Einzelbestimmung bringen sie lediglich einen Hinweis auf die Größenordnung des Fehlers gegenüber dem EBP-Wert. Dies bedeutet für die Interpretation des Ergebnisses einen Zuwachs an Sicherheit, der "wahren" Immunglobulinkonzentration näherzukommen.

Daß die Differenz zwischen RID und EBP mit zunehmender Serumkonzentration des M-Gradienten nicht nur absolut, sondern auch relativ größer wird (Tab.14), kann nach dem Gesagten nicht durch die RID bedingt sein. EBP-Werte in die Korrektur miteinbeziehen zu wollen, erscheint angesichts des Elektrophoresefehlers und der geringen Reproduzierbarkeit unzulässig. Für die Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatgel gibt es keine Korrekturmöglichkeit (HEINZEL 1974). Für die Verlaufskontrolle ist die RID durch Spezifizierung der Immunglobulin-Klassen der EBP überlegen. Auch wenn das Bestimmungsergebnis der RID nicht mit dem "wahren"

1) Behringwerke Marburg

Immunglobulingehalt übereinstimmt, bleibt in der Verlaufsbeobachtung das Ausmaß des Fehlers einigermaßen konstant. Somit hat die Methode eine klinische Bedeutung für die Verlaufsbeurteilung.

Die RID ist zur Zeit die meistangewandte Methode zur quantitativen Immunglobulinbestimmung. Modifikationen wie die von KHAYAM-BASHI et al.(1976) zur Empfindlichkeitssteigerung erweitern den Anwendungsbereich. Zur quantitativen Erfassung monoklonaler Immunglobuline ist die RID - im Gegensatz zur EBP - mit Einschränkungen hinreichend geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde auf einen Vergleich mit anderen üblichen Methoden der Immunglobulinbestimmung verzichtet, insbesondere der Rocket-Immunelektrophorese (LAURELL 1972, WEEKE 1973) und der Nephelometrie (RICCONI et al.1972, EBELING 1973, KAPP et al.1974). Nach PERRY et al. (1974) JOHANSSEN (1975) sowie BURKE und McLAUGHLIN (1976) stimmen die Werte von RID und Rocket-Immunelektrophorese gut überein. BURKE und McLAUGHLIN fanden im Gegensatz zu SLATER (1975) eine bessere Reproduzierbarkeit der RID-Ergebnisse und ziehen diese deshalb der Rocket-Immunelektrophorese für klinische Routineuntersuchungen vor. VAN MUNSTER et al.(1977) stellen Übereinstimmung von RID-Werten mit turbidimetrisch ermittelten Immunglobulinkonzentrationen fest. DEATON et al.(1976) messen die Qualität der Laser-Nephelometrie an RID und Elektroimmuno-Assay und finden hohe Korrelation. Gute Übereinstimmung von Werten der neuen Immuno-Gelfiltrations-Methode mit solchen der RID beschreibt WADSWORTH (1977).

Bei Untersuchung von M-Gradienten mit diesen Methoden sind, da immer eine Ag-Ab-Reaktion zugrundeliegt, entsprechende Probleme zu erwarten wie bei der RID. Die quantitativen Angaben der vorliegenden Arbeit ermöglichen eine bessere Beurteilung der RID-Ergebnisse bei der Bestimmung monoklonaler Immunglobuline.

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wird die Qualität der für den Methodenvergleich benutzten Techniken untersucht. Die Ergebnisse der Eiweißbestimmung mit der KJEHLDAL- und der Biuret-Methode sowie der Gravimetrie stimmen gut überein, alle drei Techniken weisen hohe Genauigkeit auf (Variationskoeffizient V = 1,6 bis 5,5 %). Die Einwaagegewichte der lyophilisierten reindargestellten Immunglobuline ergeben hingegen höhere Lösungskonzentrationen, so daß sie zum Vergleich nicht geeignet sind. Oberhalb einer Proteinkonzentration von 10 g/dl nimmt der Fehler bei der Biuret-Bestimmung erheblich zu, weshalb hochkonzentrierte Lösungen verdünnt werden müssen.

Hohe Fehlerbreite und geringe Reproduzierbarkeit kennzeichnen die Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie. Die Protein-Relationen in Albumin-Immunglobulin-Testlösungen sind abhängig vom Eiweißgehalt der Lösung und benachteiligen die Immunglobulinfraktion mit steigendem Albumingehalt immer mehr.

Für die Qualität der einfachen radialen Immundiffusion (RID) ist entscheidend, ob polyklonale oder monoklonale Immunglobuline bestimmt werden : Zwar nimmt der Variationskoeffizient für IgG nur von 4,1 auf 5,6 % zu, doch erhöht sich der systematische Fehler von o,8 auf 14 %. Für monoklonales IgM beträgt er sogar 41 %. Untersucht wird weiter der Einfluß der (meist zu kurz angegebenen) Diffusionszeit, des Ag-Molekulargewichts, der Temperatur sowie der Probenkonzentration und -zusammensetzung.

Im zweiten Teil der Arbeit werden mit der RID normale polyklonale Immunglobuline sowie M-Gradienten quantitativ bestimmt und die Ergebnisse mit Werten anderer Bestimmungsmethoden verglichen :

1. In Seren werden RID- und EBP-(Elektrophorese-Biuret-Protein)-Bestimmungen von polyklonalen und monoklonalen Immunglobulinen vorgenommen. Die RID-Ergebnisse sind bei polyklonalem IgG geringfügig höher als die EBP-Werte, bei M-Gradienten wesentlich höher : IgG 26 %, IgA 7 %, IgM 106 %.

2. In Mischlösungen aus Albumin und Rein-Immunglobulin liegen die RID-Ergebnisse für Normal-IgG um 19 %, für monoklonales IgG um 35 % und für monoklonales IgM um 140 % über den EBP-Werten.

3. Zur Feststellung des Ausmaßes von RID- und EBP-Fehler werden schließlich reine Immunglobuline untersucht. Die Konzentrationswerte für polyklonales IgG in RID, Biuret- und KJEHLDAL-Methode stimmen gut überein. Dagegen liegen die mit der RID bestimmten Konzentrationen verschiedener IgG-M-Gradienten im Mittel um 14 % über den KJEHLDAL-Werten, bei monoklonalem IgM sogar um durchschnittlich 41 %. Diese Zahlen geben den tatsächlichen Fehler der RID bei den untersuchten M-Gradienten an, so daß aus ihnen Faktoren zur Korrektur der RID-Werte berechnet werden konnten.

Die wesentlich höheren Abweichungen zwischen RID- und EBP-Ergebnissen in Seren und Mischlösungen mit M-Gradienten sind auf den Fehleranteil der Zonenelektrophorese zurückzuführen. Dieser Fehler wird am deutlichsten bei Untersuchung der Albumin-Immunglobulin-Lösungen, da hier die im Serum vorhandene Überlagerung der Immunglobuline mit anderen Globulinen wegfällt (der Fehler ist auch bei Normal-IgG nachweisbar). Die Elektrophorese ist also zur quantitativen Immunglobulinbestimmung im Methodenvergleich nicht geeignet. Bei hoher Eiweißkonzentration kann zudem die Biuret-Technik zu niedrige Ergebnisse liefern. Die in der Praxis zu beobachtenden Diskrepanzen zwischen RID- und EBP-Werten sind somit durch Fehler beider Methoden bedingt.

Als Fehlerursache bei der RID-Bestimmung von M-Gradienten wird die hohe Konzentration des immunologisch identischen Antigens angesehen, für das nicht genügend spezifisches Antiserum zur Verfügung steht. Die Ag-Ab-Komplexe müssen demnach viel weiter diffundieren als im Fall des normalen Immunglobulins, bis das zur Präzipitatbildung nötige Ag-Ab-Gleichgewicht erreicht ist. Da jeder M-Gradient spezielle Antigen-Eigenschaften besitzt, die sich im Serum in Abhängigkeit von seiner Konzentration bemerkbar machen, fällt der RID-Fehler immer wieder verschieden aus. Deshalb ist er auch nicht korrigierbar ; die angegebenen Korrekturfaktoren sollten daher nicht überbewertet werden. Sie erhöhen nur die Wahrscheinlichkeit, der "wahren" Immunglobulin-Konzentration näherzukommen und sollten nur mit den genannten Einschränkungen angewendet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

ALADJEM,F.: Diffusion theory for antigen-antibody reactions in gels. In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.III, pp. 108 - 117. (Ed.: C.A.WILLIAMS and M.W.CHASE). New York, London : Academic Press 1971

ALADJEM,F., R.L.PALDING and F.W.CHANG : On the mechanism of immunodiffusion. Immunochemistry 5 , 217 - 252 (1968)

ARMSTRONG,S.H., M.E.J.BUDKA, K.C.MORRISON and M.HASSON : Preparation and properties of serum and plasma proteins. XII: The refractive properties of the proteins of human plasma and certain purified fractions. J.Am.Chem.Soc. 69 , 1747 - 1753 (1947)

ASAMER,H., F.GABL und G.REIMER : Vergleichende Immunglobulinbestimmungen im menschlichen Serum. Wiener Klin.Wochenschr. 79 , 853 - 856 (1967)

BACKHAUSZ,R.: Immunodiffusion und Immunelektrophorese. Grundlagen, Methoden und Ergebnisse. Jena : VEB G.Fischer 1967

BAILEY,J.L.: Techniques in protein chemistry. New York,Amsterdam : Elsevier 1967

BAUMSTARK,J.S., R.J.LAFFIN and W.A.BARDAIREL : A preparative method for the separation of 7-S-Gamma-Globulins from human serum. Arch.Biochem.Biophys. 108 , 514 - 522 (1964)

BECKER,W.: Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen durch Elektrophorese in antiserumhaltigem Agarosegel. Klin.Wochenschr. 45 , 389 - 390 (1967)

BECKER,W.: Determination of antisera titres using the single radial immunodiffusion method.
Immunochemistry 6 , 539 - 546 (1969)

BECKER,W., W.RAPP, H.G.SCHWICK und K.STÖRIKO : Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 6 , 113 - 122 (1968)

BERNE,B.H.: Discrepant equations derived from the single radial immunodiffusion technique.
Immunochemistry 9 , 1256 - 1259 (1972)

BERNE,B.H.: Differing methodology and equations used in quantitating immunoglobulins by radial immunodiffusion - a comparative evaluation of reported and commercial techniques.
Cin.Chem. 20 , 61 - 69 (1974)

BOKHOUT,B.A.: Divergent results in radial immunodiffusion with antisera differing in precipitation properties with respect to individual immunoglobulin subclasses. I.The antigen factor.
J.Immunol.Methods 7 , 187 - 198 (1975 a)

BOKHOUT,B.A.: Divergent results in radial immunodiffusion with antisera differing in precipitation properties with respect to individual immunoglobulin subclasses. II.The antiserum factor.
J.Immunol.Methods 7 , 199 - 210 (1975 b)

BRAADSTREET,R.B.: A review of the KJEHLDAL determination of organic nitrogen.
Chem.Review 7 , 331 - 350 (1940)

BRAND,E.: Amino acid composition of simple proteins.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 47 , 187 - 228 (1946)

BRAND,E., B.KASSELL and L.J.SAIDEL : Amino acid composition of human plasma fractions.
J.Clin.Invest. 23 , 437 - 444 (1944)

BRAUN,H.J.: Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline. Therapiewoche 17 , 1926 - 1928 (1967)

BRAUN,H.J., F.H.BRUCHHAUS und F.W.ALY : Monoklonale Makroglobulinämien Dtsch.Med.Wochenschr. 98 , 1835 - 1842 (1973)

BURKE,M.M. and H.McLAUGHLIN : A comparison of single radial immunodiffusion and formylated rocket immunoelectrophoresis for routine immunoglobulin measurement. Ir.J.Med.Sci. 145 , 116 - 120 (1976)

CAMPBELL,R.C.: Statistische Methoden für Biologie und Medizin. Stuttgart : Thieme 1971

CHIBNALL,A.C., M.W.REES and E.F.WILLIAMS : the total nitrogen content of egg albumin and other proteins. Biochem.J. 37 , 354 - 359 (1943)

COHNEN,G., M.WERNER und O.H.ARNOLD : Quantitativ vergleichende Untersuchungen spezifischer Proteine und des papierelektrophoretischen Musters. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 73 , 817 - 821 (1967)

CROWLE,A.J.: Immunodiffusion. 2 nd ed. New York, London : Academic Press 1973

DEATON,C.D., K.W.MAXWELL, R.S.SMITH and R.L.CREVELING : Use of laser nephelometrie in the measurement of serum proteins. Clin.Chem. 22 , 1465 - 1471 (1976)

DE BRUYN,A.M. and F.KLEIN : The validity of the radial immundiffusion method for the quantitative determination of human IgM. Evaluation of a modified method. J.Immunol.Methods 11 , 311 - 320 (1976)

DENGLER,L.K. and R.P.CIAVARRA : A simplified procedure for the preparation of Sephadex-G-200 for the separation of the rat serum IgG and IgM. J.Chromatogr. 61 , 156 - 159 (1971)

DETERMANN,H.: Gelchromatographie, Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe.
Berlin,Heidelberg,New York : Springer 1967

DORFNER,K.: Ionenaustauscher.
3.Aufl. Berlin : De Gruyter 1970

EBELING,H.: Eine optimierte automatisierte Methode zur quantitativen immunologischen Antigen- und Antikörperbestimmung.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 11 , 209 - 214 (1973)

EDBERG,S.C., P.M.BRONSON and C.J.VAN OSS : The valency of IgM and IgG rabbit anti-dextran antibody as a function of the size of the dextran molecule.
Immunochemistry 9 , 273 - 288 (1972)

EGGSTEIN,M. und F.H.KREUTZ : Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweißbestimmung in Liquor und eiweißarmen Lösungen.
Klin.Wochenschr. 33 , 879 - 884 (1955)

FAHEY,J.L. and E.M.McKELVEY : Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates.
J.Immunol. 94 , 84 - 90 (1965)

FRANK,H. und P.H.KOECHER : Der Serumeiweißspiegel beim Menschen nach Untersuchungen mit der Biuret-methode.
Dtsch.Arch.Klin.Med. 197 , 181 - 190 (1950)

FRIEDMAN,H.S.: A standardized procedure for serum protein electrophoresis on cellulose acetate membrane strips.
Clin.Chim.Acta 6 , 775 - 781 (1961)

GRABAR,P. et C.A.WILLIAMS : Méthode permettant l' étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéins. Application au sérum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta 10 , 193 - 194 (1953)

GRABNER,W., D.BERGNER, D.SAILER und G.BERG : Untersuchungen zur Zuverlässigkeit quantitativer Immunglobulinbestimmungen (IgG, IgA, IgM) durch einfache radiale Immundiffusion. Clin.Chim.Acta 39 , 59 - 70 (1972)

GRANT,G.H.: Present day practice. Principles of protein estimation by radial immunodiffusion. J.Clin.Pathol. 24 , 89 - 90 (1971)

GRUBB,B.: Quantitation of immunoglobulin G by electrophorese in agarose gels containing antibodies. Scand.J.Clin.Lab.Invest. 26 , 249 - 253 (1970)

HARBOE,M., B.G.SOLHEIM and J.DEVERILL : Individual antigenic specifity of human macromolecules. Localization of antigen determinants and their use to demonstrate formation of hybrid molecules after reduction and reassociation. J.Exp.Med. 129 , 1217 - 1233 (1969)

HEIDE,K. und H.HAUPT : Darstellung noch nicht therapeutisch angewandter Plasmaproteine. Behringwerke Mitteilungen 43 , 161 - 193 (1964)

HEIDELBERGER,M. and F.E.KENDALL : Quantitative studies on the precipitin reaction. The determination of small amounts of a specific polysaccharide. J.Exp.Med. 55, 555 - 561 (1932)

HEIDELBERGER,M. and F.E.KENDALL : Quantitative studies on the precipitin reaction. The role of multiple reactive groups in antigen-antibody union as illustrated by an instance of cross-precipitation. J.Exp.Med. 59 , 519 - 528 (1934)

HEIDELBERGER,M. and F.E.KENDALL : The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. III: A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. J.Exp.Med. 61 , 563 - 591 (1935 a)

HEIDELBERGER,M. and F.E.KENDALL : A quantitative theory of the precipitin reaction. III: The reaction between crystalline egg albumine and its homologous antibody.
J.Exp.Med. 62 , 697 - 720 (1935 b)

HEINZEL,W.: Persönliche Mitteilung. Tübingen 1974

HEINZEL,W., A.VOGT, E.KALLEE and W.FALLER : A new method for the quantitative determination of antibody and antigen protein, with a sensitivity to five micrograms.
J.Lab.Clin.Med. 66 , 334 - 343 (1965)

HELD,E. und E.KALLEE : Darstellung eines immunologisch einheitlichen makromolekularen Paraproteins.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 6 , 219 - 220 (1968)

HEREMANS,J.F.: Antigen titration by single radial immunodiffusion in plates. In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.III, pp. 213 - 224.
(Ed.: C.A.WILLIAMS and M.W.CHASE).
New York, London : Academic Press 1971

HILL,R.J.: An evaluation of a method of quantitative radial immunodiffusion.
Immunochemistry 5 , 185 - 202 (1968)

HINSBERG,K. und J.GLEISS : Über die Bestimmung der Proteine im Liquor cerebrospinalis.
Klin.Wochenschr. 28 , 444 - 448 (1950)

HOPPE-SEYLER,F. und H.THIERFELDER : Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse.
10.Aufl. Berlin,Göttingen,Heidelberg : Springer 1953

HOSTY,T.A., M.HOLLENBECK and S.SHANE : Intercomparison of results obtained with five commercial diffusion plates supplied for quantitation of immunoglobulins.
Clin.Chem. 19 , 524 - 526 (1973)

HUMPHREY,J.H. and J.BATTY : International reference preparation for human serum IgG, IgA, IgM.
Clin.Exp.Immunol. 17 , 708 - 708 (1974)

JAMES,K., G.JOHNSON and H.H.FUDENBERG : The quantitative estimation of Alpha-2-Macroglobulin in normal, pathological and cord sera.
Clin.Chim.Acta 14 , 207 - 214 (1966)

JANDER,G. und E.BLASIUS : Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie.
8.Aufl. Stuttgart : S.Hirzel 1969

JANDER,G., K.F.JAHR und H.KNOLL : Maßanalyse.
11.Aufl. Berlin : De Gruyter 1966

JAUREGUI-ADELL,J.: Purification of lysozym by retention on Bio-Gel CM 30.
Biochimie 53 , 1167 - 1173 (1971)

JENSEN,K., B.L.HOIN, K.B.JENSEN and H.OLESEN : Characterization of M-components in a large municipal hospital.
Dan.Med.Bull. 16 , 165 - 170 (1969)

JOHANSSEN,B.G.: Persönliche Mitteilung . Freiburg 1975

KALFF,M.W.: Quantitative determination of serum immunoglobulin levels by single radial immunodiffusion.
Clin.Biochem. 3 , 91 - 104 (1970)

KAPP,S., W.PRELLWITZ und W.MÜLLER : Vergleichende Methoden zur quantitativen immunologischen Bestimmung und Ermittlung von Normalbereichen der Immunglobuline G, A, M, des Haptoglobins und Transferrins mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion (AIP).
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 80 , 1577 - 1580 (1974)

KHAYAM-BASHI,H., S.SLAUGHTER and R.M.BLANKEN : Quantitative estimation of secretory immunoglobulin A by radial immunodiffusion technique.
Clin.Chim.Acta 66 , 63 - 67 (1976)

KICKHÖFEN,B., D.K.HAMMER and D.SCHEEL : Isolation and characterization of Gamma-G-type immunoglobulins from bovine serum and colostrum.
Hoppe-Seyler Z.Physiol.Chem. 349, 1755-1773 (1968)

KINGSLEY,G.R. and L.A.TERZIAN : Studies on the differences between Biuret and KJEHLDAL determinations of serum proteins.
J.Lab.Clin.Med. 34 , 1175 - 1177 (1949)

KLEIN,F., A.M.DE BRUYN and H.RADEMA : Recognition of human IgM subgroups by quantitative measurement.
Clin.Exp.Immunol. 14 , 103 - 111 (1973)

KLEINSCHMIDT,J. und I.SCHLICHT : Differentialdiagnostische Bedeutung der quantitativen Serumimmunglobulinbestimmung bei Lebererkrankungen.
Med.Klin. 72 , 505 - 512 (1977)

KNEDEL,M. und A.FATEH-MOGHADAM : Säulenchromatographische Untersuchungen von Paraproteinen an Ionenaustauschern.
Klin.Wochenschr. 46 , 1078 - 1092 (1968)

KOHN,J.: A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.
Clin.Chim.Acta 2 , 297 - 303 (1957)

KOHN,J.: Small scale membrane filter electrophoresis and immuno electrophoresis.
Clin.Chim.Acta 3 , 450 - 454 (1958)

KOHN,J.: Cellulose acetate electrophoresis and immunodiffusion techniques. In: Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol.II, pp.84 - 146 (Ed. J.SMITH). London : W.Heinemann 1968

LAURELL,C.B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal.Biochem. 15 , 45 - 52 (1966)

LAURELL,C.B.: Electroimmuno assay.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 29 , Suppl.124, 21 - 37 (1972)

LESLIE,G.A. and L.W.CLEM : Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III: Immunoglobulins of the chicken.
J.Exp.Med. 130 , 1337 - 1352 (1969)

LIETZE,A., C.SINCLAIR and A.H.ROWE : An intrinsic inaccuracy of radial immunodiffusion measurement of incomplete antigens.
Clin.Biochem. 3 , 335 - 338 (1970)

LORENZ,R.J.: Vorlesung über Biometrie. Tübingen 1972

LORENZ,R.J.: Herleitung der Formeln für die Regressionsrechnung (unveröffentlicht). Tübingen 1975

LOU,K. and E.SHANBROM : Immunodiffusion techniques in clinical medicine. II: Radial immunodiffusion.
J.Am.Med.Ass. 200 , 323 - 323 (1967)

LUEKER,D.C. and A.J.CROWLE : Secondary precipitation in immunodiffusion tests.
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 23 , 65 - 80 (1963)

MANCINI, G., A.O.CARBONARA and J.F.HEREMANS : Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2 , 235 - 254 (1965)

MANCINI,G., D.R.NASH and J.F.HEREMANS : Further studies on single radial immunodiffusion - III: Qualitative analysis of related and unrelated antigen.
Immunochemistry 7 , 261 - 264 (1970)

MARCRAFT,J. and I.NEWSLANDS : Evaluation of a specific protein analyzer.
Clin.Chim.Acta 46, 399 - 405 (1973)

MASSEYEFF,R.F. and M.C.ZISSWILLER : A versatile method of radial immunodiffusion assay employing microquantities of antiserum.
Anal.Biochem. 30 , 180 - 189 (1969)

McBEAN,L.D., J.C.SMITH jr., B.H.BERNE and J.A.HALSTED : Serum zinc and alpha-2-macroglobulin concentration in myocardial infarction, decubitus ulcer, multiple myeloma, prostatic carcinoma, DOWN's syndrome and nephrotic syndrome.
Clin.Chim.Acta 50 , 43 - 51 (1974)

McCRACKEN,G.H., T.C.CHEN, J.B.HARDY and N.TZAN : Serum immunoglobulin levels in newborn infants - I: Evaluation of a radial diffusion plate method.
J.Pediatr. 74 , 378 - 382 (1969)

MILLER,L. and J.A.HOUGHTON : The micro KJEHLDAL determination of the nitrogen content of amino acids and proteins.
J.Biol.Chem. 159 , 373 - 383 (1945)

MÜLLER,H.E. und J.MÜLLER-VON VOIGT : Eine Mikromethode zur Proteinbestimmung im Serum nach der OUDIN-Technik.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 5 , 131 - 134 (1967)

MULDER,J., L.C.E.SLOOTS and M.A.T.VERHAAR : Molecular heterogeneity effects of immunoglobulin classes in radial immunodiffusion.
J.Immunol.Methods 1 , 211 - 213 (1972 a)

MULDER,J., L.C.E.SLOOTS and M.A.T.VERHAAR : Molecular heterogeneity effects of IgM-immunoglobulin in radial immunodiffusion.
J.Immunol.Methods 2 , 89 - 98 (1972 b)

MULDER,J. and M.A.T.VERHAAR : Multiple precipitation of sera containing monoclonal IgG proteins in radial immunodiffusion.
Clin.Chim.Acta 45 , 325 - 333 (1973)

MULLAN,F.A., D.M.HANCOCK and D.W.NEILL : Electrophoresis of serum and soluble liver proteins on cellulose acetate.
Nature 194 , 149 - 150 (1962)

NASH,D.R., L.SCOLARI and J.F.HEREMANS : Further studies on single radial immunodiffusion - IV: Quantitation of heterologous antigens by means of cross reacting antisera.
Immunochemistry 7 , 265 - 274 (1970)

NERENBERG,S.T.: Use of reinforced (mylar-backed) cellulose acetate membranes for quantitative radial immunodiffusion.
J.Lab.Clin.Med. 79 , 673 - 678 (1972)

NIEDERWIESER,A. and G.PATAKI (ed.): New techniques in amino acid, peptide and protein analysis.
Ann Arbor : Ann Arbor Science Publ. 1973

OUCHTERLONY,Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 26 , 507 - 516 (1949)

OUCHTERLONY,Ö.: Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis II. In: Progress in Allergy. Vol.VI, pp. 30 - 107. (Ed.: P.KALLÓS and B.H.WAKSMAN).
Basel,New York : S.Karger 1962

OUDIN,J.: Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélique.
Compt.Rend.Acad.Sci. 222 , 115 - 119 (1946)

OUDIN,J.: La diffusion d'un antigène dans une colonne de gél contenant les anticorps précipitants homologues. Étude quantitative de trois principales variables.
Compt.Rend.Acad.Sci. 228 , 1890 - 1898 (1949)

OUDIN,J.: Qualitative analysis of antigen-antibody reactions in gels. In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.III, pp.118 - 145.
(Ed.: C.A.WILLIAMS and M.W.CHASE).
New York, London : Academic Press 1971

PARNAS,J.K. und R.WAGNER : Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach KJEHLDAL.
Biochemische Zeitschrift 125 , 253 - 256 (1921)

PERRY,J.J., P.F.BRAY and T.N.HACKETT,Jr.: Comparison of electroimmunodiffusion and radial immunodiffusion for measurement of IgG in the laboratory diagnosis of multiple sclerosis.
Clin.Chem. 20 , 1441 - 1443 (1974)

PETRIE,G.F.: A specific precipitin reaction associated with the growth on agar plates of meningococcus, pneumococcus and B.dysenteriae (Shiga).
Brit.J.Exp.Pathol. 13 , 380 - 394 (1932)

PERPER,R.J., J.T.OKIMOTO, K.C.COCHRIM, N.RAMSEY and J.S.NAJARIAN : A rapid method for purification of large quantities of anti-lymphocytic serum.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125 , 575 - 591 (1967)

PRELLWITZ,W. und C.H.HAMMER : Chromatographische, sedimentanalytische, immunologische und stärkegelelektrophoretische Untersuchungen an Paraproteinen.
Klin.Wochenschr. 44 , 989 - 998 (1966)

RÄSÄNEN,J.A.: The calculation of antigen concentrations in the single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 11 , 519 - 520 (1974)

RAJEWSKY,K., V.SCHIRRMACHER, S.NASE and N.K.JERNE : The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.
J.Exp.Med. 129 , 1131 - 1143 (1969)

REIMER,C.B.and S.E.MADDISON : Standardization of human immunoglobulin quantitation - a review of current status and problems.
Clin.Chem. 22 , 577 - 582 (1976)

REIMER,C.B., D.J.PHILLIPS, S.E.MADDISON and S.L.SHORE : Comparative evaluation of commercial precipitating antisera against human IgM and IgG.
J.Lab.Clin.Med. 76 , 949 - 960 (1970)

RICCONI,H., P.L.MASSON and J.F.HEREMANS : Evaluation of the Technicon automated specific protein analytical system. In: Automated Immuno-Precipitin-Reactions (AIP). New methods, techniques and evaluations, pp. 53 - 67. (Ed. J.D.HAMM). Tarrytown,N.Y.: Technicon Instrum.Corp. 1972

RICHTER,W.: Micromethod for immunochemical quantitation of dextran and studies on role of antigen size in single radial immunodiffusion. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 43 , 700 - 715 (1972)

ROBINSON,H.W. and C.G.HOYDEN : The gravimetric determination of blood serum proteins. J.Biol.Chem. 140 , 853 - 867 (1941)

ROBINSON,H.W., J.W.PRICE and C.G.HOYDEN : The estimation of albumine and globulin in blood serum - I: A study of the errors involved in the filtration procedure. J.Biol.Chem. 120 , 481 - 498 (1937)

ROWE,J., B.GRAB and S.G.ANDERSON : An international reference preparation for human serum immunoglobulin G,A and M: content of immunoglobulins by weight. Bull.WHO 46 , 67 - 79 (1972)

RYAN,C.A.: Quantitative determination of soluble cellular proteins by radial diffusion in agar gels containing antibodies. Anal.Biochem. 19 , 434 - 440 (1967)

SACHS,L.: Angewandte Statistik. Planung und Auswertung, Methoden und Modelle. 4.Aufl. Berlin,Heidelberg,New York : Springer 1974

SCHEIDEGGER,J.J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 7 , 103 - 110 (1955)

SCHMID,P.: Quantitation of antigen in radial immunodiffusion plates.
Clin.Chim.Acta 26 , 181 - 182 (1969 a)

SCHMID,P.: Dependence of radial immunodiffusion of fibrinogen on time and antigen concentration.
Clin.Chim.Acta 26 , 183 - 184 (1969 b)

SCHULTZE,H.E. und G.SCHWICK : Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen.
Clin.Chim.Acta 4 , 15 - 25 (1959)

SCHUMACHER,K.: Methoden zur Isolierung von Antikörpern vom IgM-Typ.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 4 , 196 - 198 (1966)

SCHUMACHER,K. und M.KESSLER : Quantitative Bestimmung von Serumproteinen durch radiale Immundiffusion.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 6 , 193 - 197 (1968)

SHER,J.H.: Two-step mixed indicator for KJEHLDAL nitrogen titration.
Anal.Chem. 27 , 831 - 832 (1955)

SLATER,L.: IgG, IgA and IgM by formylated rocket immunoelectrophoresis.
Ann.Clin.Biochem. 12 , 19 - 26 (1975)

SOBEL,A.E., H.YUSKA and J.COHEN : A convenient method of determining small amounts of ammonia and other bases by the use of boric acid.
J.Biol.Chem. 118 , 443 - 446 (1937)

STIEHM,E.R.: Radial diffusion technique for the quantitative estimation of precipiting antibody.
J.Lab.Clin.Med. 70 , 528 - 534 (1967)

SUGG,U. und H.KOCH : Die Empfindlichkeit der Rheophorese im Vergleich zu anderen Immunpräzipitationsmethoden.
Med.Welt (in Veröffentlichung) (1978)

SUNDERMAN,W., F.W.SUNDERMAN, E.A.FALVO and C.J.KALLICK : Studies of the serum proteins - II: The nitrogen content of purified serum proteins separated by continuous flow electrophoresis.
Am.J.Clin.Pathol. 30 , 112 - 119 (1958)

TICHÝ, M., Z.HRNČIŘ and Z.HRKAL : The properties of IgM-L-Pyroglobulin.
Clin.Chim.Acta 36 , 363 - 368 (1972)

ULLMANN,U. und B.HESS : Darstellung und Eigenschaften von normalen und pathologischen Makroglobulinen.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 6 , 372 - 376 (1968)

VAERMAN,J.P., A.M.LEBACQ-VERHEYDEN, L.SCOLARI and J.F.HEREMANS : Further studies on single radial immunodiffusion - I: Direct proportionality between area of precipitate and reciprocal of antibody concentration.
Immunochemistry 6 , 279 - 285 (1969 a)

VAERMAN,J.P., A.M.LEBACQ-VERHEYDEN, L.SCOLARI and J.F.HEREMANS : Further studies on single radial immunodiffusion - II: The reversed system: Diffusion of antibodies in antigen-containing gels.
Immunochemistry 6 , 287 - 293 (1969 b)

VAN DER HOVEN,A., J.D.CONRADIE, M.BUBB and L.VISSER : The isolation of immunogenically pure IgM from COHN fraction III of pooled normal human plasma.
Immunochemistry 10 , 107 - 114 (1973)

VAN MUNSTER,P.J.J., G.E.J.M.HOELEN, M.SAMWEL-MANTINGH and M.HOLTMAN-VAN MEURS : A turbidimetric immuno assay (TIA) with automated individual blank compensation.
Clin.Chim.Acta 76 , 377 - 388 (1977)

VERBRUGGEN,R.: Quantitative immunoelectrophoretic methods. A literature survey.
Clin.Chem. 21 , 5 - 43 (1975)

VERGANI,C., R.STABILINI and A.AGOSTONI : Quantitative determination of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion on cellulose acetate.
Immunochemistry 4 , 233 - 237 (1967)

VEYS,E.M. and R.J.WIEME : Serum IgG, IgM and IgA concentration determined by the "linear plate" immunodiffusion technique in a normal population.
Clin.Chim.Acta 47 , 295 - 306 (1973)

WADSWORTH,C.: A new specific quantitation-in-gel method differentiating commercial human serum standards intended for RID analyses.
Scand.J.Immunol. 6 , 97 - 107 (1977)

WEEKE,B.: Rocket immunoelectrophoresis. In: A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications, pp. 37 - 46. (Ed.: N.H.AXELSEN, J.KROLL and B.WEEKE).
Oslo : Unversitetsforlaget 1973

WEICHSELBAUM,T.E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.
Am.J.Clin.Pathol. 10 , 40 - 49 (1946)

WIEME,R.J.: Application diagnostique de l'enzyme-électrophorèse des déshydrogenases de l'acide lactique.
Clin.Chim.Acta 4 , 46 - 50 (1959)

WIRTH,K., U.ULLMANN, K.BRAND, K.HUTH und B.HESS : Analyse von Globulinen mit der Gelfiltration.
Klin.Wochenschr. 43 , 528 - 532 (1965)

WORK,B. and E.WORK (ed.): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol.1.
Amsterdam, London : North Holland Publ.Co. 1969

LEBENSLAUF

Am 10.9.1948 wurde ich, Helmbrecht Koch, als Sohn des Dr.rer.agr. Hermann Koch und der Julie Koch in Stuttgart geboren. Nach der Grundschule besuchte ich von 1959 bis zum Abitur 1967 das humanistische Karlsgymnasium in Stuttgart. Anschließend begann ich in Tübingen das Studium der Biochemie, das ich mit Vorprüfungen etwa fünf Semester lang betrieb. 1968 fing ich zusätzlich ein Medizinstudium an und studierte nach dem Physikum 1970 nur noch Medizin. Am 29.1.1974 legte ich in Tübingen das Medizinische Staatsexamen ab.

Durch ein Graduiertenstipendium wurde mir die Promotion im Eiweißlabor der Medizinischen Klinik Tübingen bei Prof. Braun ermöglicht, die ich während der Medizinalassistentenzeit an dieser Klinik fortsetzte. Später arbeitete ich als Medizinalassistent in der Chirurgischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses in Berlin sowie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München. 1976 begann ich die Ausbildung zum Facharzt für Neurologie und Psychiatrie an der Tübinger Nervenklinik, seit März 1977 bin ich an der Neurologischen Klinik Tübingen als Assistent tätig.

LEBENSLAUF